

王浆高产蜜蜂咽下腺磷酸化蛋白质组分析

鲁小山^{1,2}, 韩宾², 张兰², 冯毛², 房宇², 李荣丽², 周天娥^{1,2}, 李建科²

(¹郑州大学生物工程系, 郑州 450001; ²中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100093)

摘要:【目的】通过对王浆高产蜜蜂 (*Apis mellifera* L.) (浙江浆蜂) 哺育蜂 (6-12 d) 咽下腺的磷酸化蛋白质组分析, 以期探明蛋白质磷酸化修饰对王浆分泌的生物学意义。【方法】将哺育蜂咽下腺蛋白质液内酶切后, 用固相金属离子亲和层析色谱法 (IMAC)、强阳离子交换 (SCX) 及 LC-MS/MS 和生物信息学分析, 对工蜂咽下腺磷酸化蛋白质组进行研究。【结果】在哺育蜂的咽下腺中, 共鉴定 117 个蛋白质, 其中 6 个蛋白质的 6 条磷酸肽段的 8 个位点发生磷酸化修饰。这些磷酸化蛋白质是王浆主蛋白 1 和 7 的前体、与蛋白翻译合成相关的 60S 酸性核糖体蛋白 P0、P1、P2 和 60S 核糖体蛋白 L15。【结论】哺育蜂咽下腺核糖体蛋白发生的磷酸化修饰主要为促进王浆蛋白的高效合成, 而磷酸化的王浆蛋白 1 和 7 可保证浆蜂在王浆高产的前提下仍保证其王浆具合理的钙磷比, 提高营养价值, 以满足蜂王产卵和幼虫发育的营养需求。研究结果在蛋白质磷酸化水平上为揭示浆蜂王浆的高产机理奠定了新的理论基础。

关键词: 哺育蜂; 浆蜂; 咽下腺; IMAC; SCX; 磷酸化蛋白质组

Phosphoproteome Analysis of Hypopharyngeal Glands of High Royal Jelly Producing Bee (*Apis mellifera* L.)

LU Xiao-shan^{1,2}, HAN Bin², ZHANG Lan², FENG Mao², FANG Yu², LI Rong-li², ZHOU Tian-e^{1,2}, LI Jian-ke²

(¹Department of Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001; ²Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093)

Abstract: 【Objective】High royal jelly producing bee (*Apis mellifera* L.) is the unique honeybee resource in China. However, the mechanism of high royal jelly producing has not been clearly addressed. In order to reveal the significance of protein phosphorylation in hypopharyngeal gland for royal jelly synthesis and secretion, the phosphoproteome of hypopharyngeal gland of nurse bee (6-12 day) was analyzed. 【Method】IMAC (immobilized metal-affinity chromatography) phosphoprotein enrichment, SCX (strong cation exchange) separation, LC-MS/MS (liquid chromatography-mass/mass) identification and bioinformatics analysis were applied to analyze phosphoproteome of hypopharyngeal gland of nurse bee. 【Result】Of the identified 117 proteins in the hypopharyngeal gland, 6 of them were phosphorylated on 6 phosphopeptides and assigned 8 phosphorylated sites. They were related to protein translation and synthesis, such as 60S acidic ribosomal proteins P0, P1, P2 and 60S ribosomal protein L15, and major royal jelly proteins 1 and 7 precursor. 【Conclusion】The phosphorylation modifications occurred on ribosome proteins of hypopharyngeal gland mainly contribute to the high efficiency of synthesizing and secreting of royal jelly protein. The phosphorylation of royal jelly proteins 1 and 7 maintain the reasonable ratio of calcium to phosphorus of royal jelly with the increasing yield, thus meeting the nutrition demand of fertile egg-laying queens and developing larvae. Hence, the data obtained in this study will provide new knowledge to deeply understand the mechanism how high royal jelly producing bees could produce higher amount of royal jelly at the level of protein phosphorylation.

Key words: nurse bee; high producing royal jelly bee; hypopharyngeal gland; IMAC; SCX; phosphoproteome

收稿日期: 2013-05-13; 接受日期: 2013-06-17

基金项目: 国家现代农业产业技术体系 (蜜蜂) (CARS-45-KXJ13)

联系方式: 鲁小山, Tel: 010-62591449; E-mail: lushanxiao@163.com. 通信作者李建科, Tel: 010-62591449; E-mail: apislijk@126.com

0 引言

【研究意义】咽下腺是位于工蜂头内两侧呈葡萄状盘旋的外分泌腺, 是工蜂分泌王浆的主要腺体^[1]。王浆不仅是养蜂业的重要蜂产品, 而且还为蜜蜂幼虫和蜂王提供营养, 决定蜜蜂的级型分化^[2]。众所周知, 王浆具有提高人类免疫力、延缓衰老和抗癌抗菌等作用^[3]。因此, 蜂王浆高产对提高养蜂经济效益和促进人类健康具有重要意义。中国已从意大利蜜蜂 (*Apis mellifera* L.) (意蜂) 中成功培育出王浆高产的浆蜂, 尽管其高产机理已从遗传^[4]、形态^[5]和分子水平^[6]进行了一些研究, 但是在蛋白质磷酸化水平对浆蜂工蜂咽下腺的研究还未见报道。蛋白质翻译后修饰是蛋白质发挥生理活性过程中最为重要的修饰之一, 而蛋白质磷酸化和去磷酸化是调节生命活动的一个重要翻译后修饰过程, 它对细胞的增殖、发育和分化, 神经活动, 肌肉收缩, 新陈代谢等具有至关重要的调控作用^[7]。

【前人研究进展】经过王浆高产选育, 浆蜂咽下腺较意蜂具有更大的腺体体积, 腺细胞增大, 线粒体、粗面内质网面积增大, 核仁数目增多, 分泌周期延长, 增加了产浆量^[5,8]。浆蜂的王浆高产已形成可遗传的性状^[4], 且王浆产量的提高并没有造成浆蜂与意蜂王浆功能蛋白质的差异^[9]。为了适应王浆高产的需要, 浆蜂的咽下腺发育在分子水平上也发生了显著变化, 其蛋白质合成能力显著提高以保证王浆中蛋白的含量, 细胞骨架类蛋白表达量的显著增加以满足增大的腺体细胞维持形态的要求, 抗氧化系统功能的加强使腺体细胞免受损害, 与能量代谢相关的蛋白表达的提高以满足产浆过程腺体对代谢能的需求^[8]。蛋白质经磷酸化修饰后与细胞的增殖、分化和发育、新陈代谢密切相关^[7], 真核生物蛋白的磷酸化修饰通常发生在丝氨酸 (Ser)、苏氨酸 (Thr) 和酪氨酸残基 (Tyr), 其中, Ser 残基发生磷酸化修饰比例最高, 其比例为 1 800 : 200 : 1^[10-11]。一般磷酸化肽段数仅占总肽段数的 1%—2%, 常淹没在大量非磷酸化肽段中, 并且磷酸键与肽键相比, 更容易断裂, 磷酸基团在质谱分析中经常发生脱落丢失, 容易造成漏检。因此, 有效地富集磷酸化肽段是当前磷酸化蛋白质组研究的一个主要技术挑战。目前已开发了较为有效的磷酸化肽段富集方法, 如 TiO_2 、IMAC 和亲核色谱等方法^[12-13], 这为研究蜜蜂咽下腺发育期的蛋白质磷酸化提供了技术保障。【本研究切入点】哺育蜂是分泌王浆的重要时期, 因此在磷酸化蛋白质组水平上研究咽下腺蛋白质

的磷酸化修饰对其自身发育和产浆的生物学机理, 可深入认识浆蜂的王浆高产生物学。【拟解决的关键问题】试图阐明浆蜂哺育蜂咽下腺的磷酸化蛋白对促进其王浆高产所具有的重要生物学意义。

1 材料与方法

试验于 2012 年 2 月至 2013 年 3 月在中国农业科学院蜜蜂研究所完成。

1.1 化学试剂

$\text{Ti}(\text{SO}_4)_2$ (硫酸钛)、考马斯亮兰 (CBB) G-250、Tris 碱、硫脲、CHAPS (3-[3-(胆酰胺丙基)二甲氨基]丙磺酸内盐)、DTT (二硫苏糖醇) 购自 Amresco; GTP (固定钛离子亲和色谱材料) 来自于中国科学院大连化物所; IAA (碘乙酰胺) 来自 Merk 公司; 尿素购自 Solarbio 公司; Trypsin 酶来自于 Promega; zip-tip 来自 Millipore 公司; ACN (乙腈) 购于 Fisher 公司; 丙酮和 TFA (三氟乙酸) 购于 J.T.Baker 公司; 甲酸来自于 MREDA Technology 公司。

1.2 IMAC 材料的制备

(1) 按照 GTP 材料 $\text{Ti}(\text{SO}_4)_2=1/100$ (M/M), 称量 GTP 材料 20 mg, 然后将两者加入到烧杯中, 加入约 20 mL 水, 匀浆搅拌, 室温过夜反应; (2) 将匀浆好的材料转移到 10 mL 离心管中, 13 500 g, 离心 3 min, 弃掉上清液; (3) 向步骤 2 的沉淀中加入一定体积的水, 震荡洗涤未键合的 Ti^{4+} , 13 500 g, 离心 3 min, 弃掉上清液。重复水洗 6 次左右, 目的是尽量洗干净 Ti^{4+} ; (4) 盐洗: 使用 50%ACN/6%TFA/200 mmol L^{-1} NaCl 水溶液洗涤 IMAC (固相金属离子亲和色谱) 材料 2 次; (5) 水洗: 盐洗之后的 IMAC 材料, 再用水洗涤 2—3 次, 然后均匀转移到 2 个 1.5 mL 离心管中, 离心弃掉上清保存, 每一个离心管中为 10 mg 的 IMAC 材料。

1.3 取样

试验所用浆蜂为浙江浆蜂, 饲养于中国农业科学院蜜蜂研究所试验蜂场并进行取样。取即将羽化出房浆蜂工蜂的子脾, 放入 34℃ 培养箱中过夜。然后用染料标记刚出房的工蜂, 记为 1 日龄, 将其放回原箱中。待 10 日龄将其取出, 用实体显微镜解剖工蜂头部, 取得咽下腺, 样品取自 5 个蜂群, 每群取 100 只, 然后将 5 群的样品合并一起直接进行蛋白提取或者 -80℃ 储存备用。

1.4 试验方法

1.4.1 蛋白提取 蛋白提取参照张兰等^[14]的方法。

每 50 mg 咽下腺中加入 300 mL LB (lysis buffer), 冰浴充分研磨、超声, 直至腺体充分溶解。4°C, 13 500 g, 15 min, 离心 2 次, 避开脂肪层吸取上清液, 丙酮冰浴沉淀 30 min, 4°C, 13 500 g, 15 min, 离心 2 次, 弃掉上清液, 4°C 干燥 5 min, 40 mmol L⁻¹ NH₄HCO₃ 充分溶解沉淀后测定蛋白浓度。

1.4.2 蛋白质液内酶切 按蛋白溶液: DTT=10:1 (V/V) 加入 100 mmol L⁻¹ 的 DTT, 室温放置 1 h, 然后按 DTT 的 5 倍体积加入 100 mmol L⁻¹ 的 IAA, 室温避光放置 1 h, 蛋白和酶按照 62.5:1 (M/M) 的比例加入 Trypsin, 37°C 恒温酶切 12—14 h。酶切后加入 2 μL TFA 终止酶切反应。

1.4.3 IMAC 富集磷酸肽 酶解液在 4°C, 13 500 g 离心 5 min, 取上清 500 μL 加入到经 500 μL binding buffer (80%ACN/6%TFA 水溶液) 重悬的 IMAC 材料中 (5 mg), 震荡 30 min, 13 500 g 离心 5 min, 弃上清液; 加入 1 mL wash buffer 1 (50% ACN/6% TFA/200 mmol L⁻¹ NaCl 水溶液) 重悬, 震荡 30 min, 13 500 g 离心 5 min, 弃上清液; 加入 1 mL wash buffer 2 (30% ACN/0.1% TFA 水溶液) 重悬, 震荡 30 min, 13 500 g 离心 5 min, 弃上清液; 加入 200 μL elution buffer (500 mmol L⁻¹ K₂HPO₄, pH 7) 重悬, 震荡 30 min, 为保证较高的洗脱效率, 可以洗脱 2 次。

1.4.4 除盐 采用 zip-tip 除盐: wetting buffer (80%ACN, 0.3%TFA 水溶液) 活化 C18 柱子; equilibrium buffer (0.1%TFA 水溶液) 平衡 C18 柱子; 用 zip-tip 反复抽吸洗脱液数次; desalting buffer (0.1%TFA 水溶液) 洗盐; elution buffer (70%ACN, 0.1%TFA 水溶液) 洗脱磷酸化样品。干燥洗脱液, 进行随后的试验或者 -20°C 保存。

1.4.5 SCX (强阳离子交换) 及质谱分析 为了取得较好的质谱分析结果, 采用了在线二维分离技术: 先用 SCX 对样品进行预分离, 降低其复杂度, 然后使用 360 nL 大容量芯片 (Enrichment: 360 nL; Separation: 150 mm×75 μm) 对样品进行有效富集和分离, 以提高磷酸化肽段的丰度, 使低丰度的磷酸化肽段得以检测。该步骤可分为上样和梯度洗脱。上样: 将干燥的咽下腺磷酸化样品用 0.1% 的甲酸重溶, 加入上样瓶, 放入自动进样器 (温度保持在 4°C) 中准备上样。然后将 SCX 柱子 (Agilent 50 mm) 连接在 HPLC 和质谱之间, 先将样品利用液相 (1%TFA/water), 按 0.25 μL·min⁻¹ 的流速结合到 SCX 柱上, 未结合到 SCX 柱上的样品则先结合到富集柱, 然后用流动相按 0.3

μL·min⁻¹ 的流速将之洗脱到分析柱, 进行随后的质谱分析, 所用的液相洗脱梯度为: 3% ACN、0 min, 8% ACN、1 min, 20% ACN、30 min, 40% ACN、35 min, 85% ACN、40 min, 3% ACN、45 min。样品梯度洗脱: 样品结合到 SCX 柱之后, 分别用 5、10、20、30、50、70 mol L⁻¹ NH₄HCO₃ 盐溶液梯度将样品洗脱为不同的组分, 接着在线利用液质连用系统 (LC Q-TOF G6520, Agilent Technologies, USA) 对蛋白样品进行分析, 样品进入质谱后的液相洗脱梯度为: 3% ACN、0 min, 3% ACN、5 min, 4% ACN、7 min, 5% ACN、10 min, 10% ACN、15 min, 12% ACN、20 min, 12% ACN、25 min, 13% ACN、30 min, 20% ACN、40 min, 50% ACN、45 min, 50% ACN、50 min, 85% ACN、55 min, 85% ACN、60 min, 3% ACN、65 min。质谱通过 Masshunter (Agilent Technologies) 采集数据, 其参数设置如下: Vcap (电喷雾电压): 2 000V; 干燥气体流速: 2.5 L min⁻¹; 干燥气体温度: 300°C; 碎裂电压: 175 V; 扫描电压: 65 V; 基准质荷比: 149.02332 和 1221.02332; 一级母离子扫描速度: 3 spectra/s; 二级碎片离子扫描速度: 3 spectra/s; 碰撞能: charge (电荷): all, slope (斜率): 3, offset (截距): 2; 母离子最大扫描值: 5; 上样量: 5 μL。质谱采集到的数据为 Profile 格式, 以便后续的 Peaks 软件的生物信息学分析。

1.4.6 生物信息学分析 利用 Peaks 软件对所得质谱分析数据进行生物信息学分析, 先对质谱数据从头测序 (De novo) 计算, 然后再进行数据库搜索, 搜索参数: 母离子电荷为 2—4; 容忍误差 (Error Tolerance): 母离子质量数最大容许误差范围 (Parent ion) 为 ±20 ppm, 碎片离子 (Fragment ion) 最大容许误差范围为 0.05 Da; Enzyme: TPCK 修饰的胰蛋白酶 (Trypsin, 蛋白质组学级), 在肽段末端允许有一个非特异性断裂 (Maximum missed cleavages per peptide), 每条肽段最多允许有 2 个漏切位点 (Maximum missed cleavages per peptide); 固定修饰 (fixed modifications) 为 Carbamidomethylation; 可变修饰 (variable modifications) 为 Oxidation (M) 和 Phosphorylation (STY), 每个肽段最多允许有 3 种翻译后修饰 (Maximum allowed variable PTM per peptide)。数据库为蜜蜂库 (2012 年 8 月从 NCBI 数据库下载, 含有 9 975 个条目); 假阳性率 (FDR) 利用反库 (decoy) 估算 FDR 值 (Estimate FDR with decoy-fusion), 并控制在 1% 以下, 被鉴定蛋白至少应有 2 个以上的

unique 肽段, 且正确的概率 >95%。

2 结果

2.1 王浆高产蜜蜂哺育蜂咽下腺磷酸化蛋白质与工蜂咽下腺磷酸化肽段鉴定

经对质谱数据的生物信息分析, FDR < 0.8, 在浆蜂工蜂咽下腺中发现了 177 个蛋白, 其中有 6 个磷酸化蛋白质 (表 1), 6 条磷酸化肽段及 8 个磷酸化位点

(表 2)。

王浆主蛋白 1 前体在 T²²⁷ 位有一个磷酸化位点, 王浆主蛋白 7 前体在 S⁴²⁶ 位有一个磷酸化位点, 60s 酸性核糖体蛋白 P0 在 S³⁰⁴ 和 S³⁰⁶ 位有 2 个磷酸化位点, 60S 酸性核糖体蛋白 P1 在 S¹⁰¹ 位有 1 个磷酸化位点, 60S 酸性核糖体蛋白 P2 在 Y¹⁰⁹ 和 S¹¹⁸ 位有 2 个磷酸化位点, 60S 核糖体蛋白 L15 S¹⁹⁹ 位有 1 个磷酸化位点。

表 1 王浆高产蜜蜂哺育蜂咽下腺磷酸化蛋白质的鉴定

Table 1 Identification of phosphoprotein in hypopharyngeal glands of high royal jelly producing nurse bees

蛋白名称 Protein name	登录号 Accession number	分数 Score (-10lgP)	序列覆盖率 Sequence coverage rate (%)	特异肽段数 Unique peptide number	分子量 Molecular weight (kD)
王浆蛋白 1 前体 Major royal jelly protein 1 precursor	gi 58585098	396.36	85	61	48.89
王浆蛋白 7 前体 Major royal jelly protein 7 precursor	gi 62198227	272.7	54	17	50.54
60S 酸性核糖体蛋白 P0 60S acidic ribosomal protein P0 isoform 1	gi 66559310	112.15	16	5	34.42
60S 酸性核糖体蛋白 P1 60S acidic ribosomal protein P1	gi 297591983	89.18	43	5	11.62
60S 酸性核糖体蛋白 P2 60S acidic ribosomal protein P2	gi 110765226	83.08	37	4	12.00
60S 核糖体蛋白 L15 60S ribosomal protein L15	gi 66506623	96.62	25	6	23.89

蛋白登录号是与网络数据库唯一对应的编号; 蛋白分数由 Peaks 利用 -10lgP 计算得到; 序列覆盖率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值; 特异肽段数是只存在于一个蛋白类中的一个蛋白质上的肽段数; 分子量是在 Peaks 结果中列出的理论值

Accession number was the unique number given to mark the entry of a protein in the database of NCBI; Peaks score was calculated by -10lgP; Sequence coverage was the ratio of the number of amino acids in every peptide that matches with the mass spectrum divided by the total number of amino acids in the protein sequence; Unique peptide existed only in one protein of a proteome; Molecular mass were the theoretical value obtained by PEAKS search

表 2 王浆高产蜜蜂工蜂咽下腺磷酸化肽段鉴定

Table 2 Identification of phosphopeptides in hypopharyngeal glands of royal jelly producing worker bees

蛋白名称 Protein name	修饰肽段及位点 Modified peptides and sites	分数 Score (-10lgP)	分子量 Mass (kD)	位点 Site
王浆蛋白 1 前体 Major royal jelly protein 1 precursor	R.MT ^S SNTFDYDPKFTK.M	22.52	1773.732	226—239
王浆蛋白 7 前体 Major royal jelly protein 7 precursor	R.CTNFNINQNDSS ^P DENNDSSIR.I	50.9	2464.908	416—435
60S 酸性核糖体蛋白 P0 60S acidic ribosomal protein P0 isoform 1	K.KEES ^P ES ^P EDEDMGFGLFD	54.01	2122.7	301—317
60S 酸性核糖体蛋白 P1 60S acidic ribosomal protein P1	K.KEEPES ^P DDDMGFGLFD	42.36	2135.792	94—111
60S 酸性核糖体蛋白 P2 60S acidic ribosomal protein P2	R.LLKPGAPTNY ^P SDEEDEGS ^P QLENETK.S	16.24	3052.248	99—114
60S 核糖体蛋白 L15 60S ribosomal protein L15	R.NLSL ^P LRR.K	16.92	924.4542	196—202

磷酸化氨基酸用 S^P、T^P 或者 Y^P 标记; 分数由 Peaks 利用 -10lgP 计算得到; 分子量是 Peaks 结果中的理论值; 位点是指在蛋白序列中肽段起始氨基酸和终止氨基酸的位点

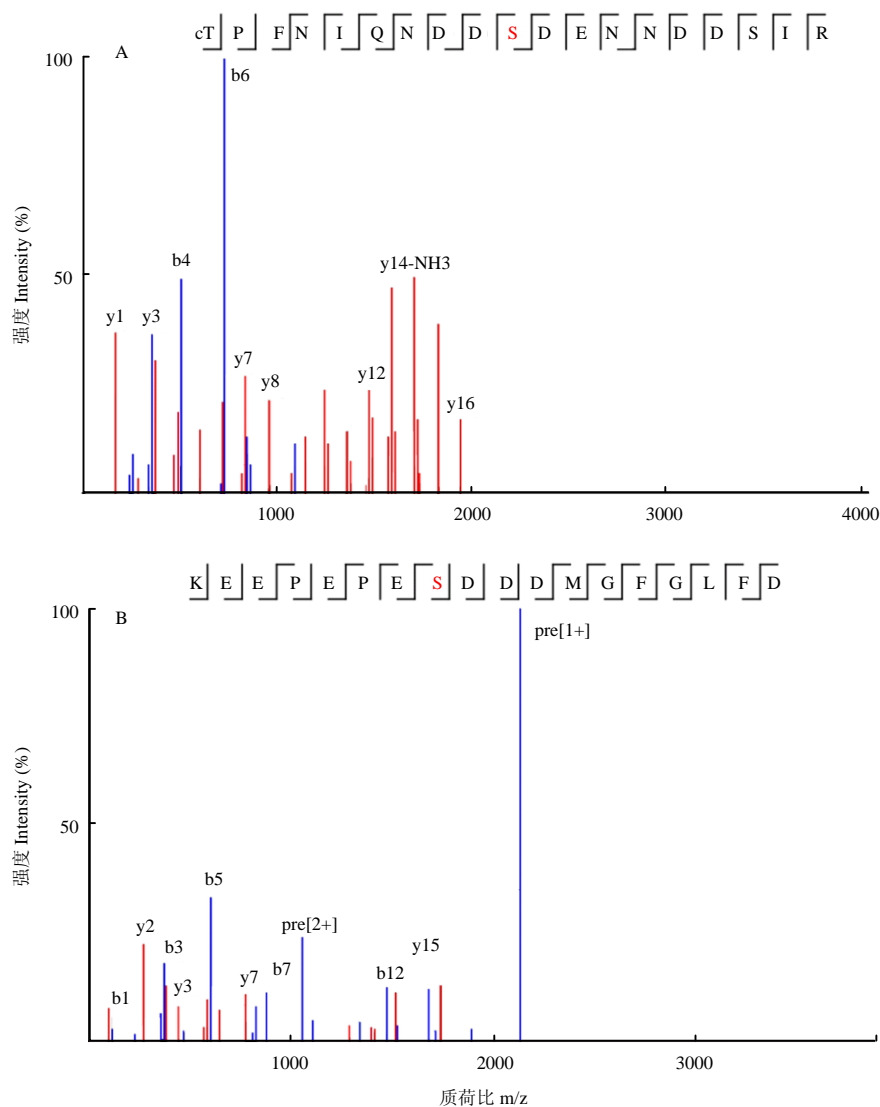
Phosphorylated amino acid was labeled with S^P, T^P or Y^P; Peaks score was calculated by -10lgP; Molecular mass were the theoretical value obtained by PEAKS search; Site was the position of the initial and final amino acids of the peptide in the protein sequence

2.2 质谱分析

图显示王浆主蛋白前体 7 在第 11 个氨基酸 (丝氨酸) 上有 1 个磷酸化位点, 在丝氨酸左边断裂形成 1 个 y 离子, 在其右边断裂形成 1 个 b 离子, 且整条肽段的断裂程度较高, 基本可以确定磷酸化修饰的位点。

3 讨论

咽下腺是合成和分泌王浆的主要腺体, 而哺育期是工蜂分泌王浆的主要时期^[15], 利用 IMAC 磷酸肽富集法对王浆高产蜜蜂哺育蜂咽下腺磷酸化蛋白质组进行了初步研究, 共发现了 6 个磷酸化蛋白质的 6 条磷



A: 王浆主蛋白 7 前体二级质谱图; B: 60S 酸性核糖体蛋白 P1 二级质谱图。图谱中 X 轴代表碎片离子的质荷比, Y 轴代表相对于母离子的碎片离子的强度。b、y 离子用不同的颜色标记, 蓝色代表 b 离子, 红色代表 y 离子, 其中 pre[1+]代表正一价的母离子, pre[2+]代表正二价的母离子, 红色字母 S 代表磷酸位点

A: Tandem mass spectra of major royal jelly protein 7 precursor; B: Tandem mass spectra of 60S acidic ribosomal protein P1. Axis X was mass-to-charge ratio of fragment ion. Axis Y was the intensity of fragment ion compared to precursor ion. The spectra were labeled with different color codes, where the blue and red represented ion of b, y, respectively. And pre[1+] was precursor ion with one charge, pre[2+] was precursor ion with two charge. The red letter S meant the phosphorylation site

图 王浆蛋白 7 前体和 60S 酸性核糖体蛋白 P1 二级质谱图

Fig. Tandem mass spectra of major royal jelly protein 7 precursor and 60S acidic ribosomal protein P1

酸化肽段在 8 个位点发生磷酸化修饰。蛋白磷酸化修饰通过改变蛋白质的溶解性功能活性或者在一个或多个氨基酸上增加磷酸基团, 来改变蛋白的活性、结合位点及与其他蛋白之间的相互作用^[7]。在本试验中检测到的与核糖体装配、核糖体活性、肽段延伸和王浆主蛋白家族相关的蛋白发生了磷酸化修饰, 这些蛋白对促进浆蜂咽下腺分泌蛋白能力的提

高发挥了重要作用。

核糖体是合成蛋白的重要细胞器。60S 酸性核糖体蛋白由 P0、P1、P2 组成的五聚体复合物 (P1)₂(P0)(P2)₂^[16]通过 P0 蛋白的 N 末端与 28SrRNA 的一个保守结构域组成 GTPase 相关位点^[17], 参与蛋白合成延伸阶段的调节^[18], 它同时还对维持核糖体活性和稳定性具有重要作用^[19]。酸性核糖体蛋白 P1 和 P2 在

细胞中以 2 种状态存在, 一种游离在胞质中, 另一种是通过酸性核糖体蛋白 P0 锚定在核糖体蛋白上, 2 种状态的酸性核糖体 P 蛋白处于一种动态转换的过程中^[20-21]。当 P1、P2 蛋白以游离态存在时, P0 蛋白是维持核糖体活性的必要条件^[22]。按照细胞代谢的需要, 可以通过调节与核糖体结合的 P 蛋白数目来调控核糖体的活性^[23]。在生物体内, C 末端丝氨酸的磷酸化修饰是 P1 蛋白水解的先决条件, 同时 P2 的磷酸化修饰及 N-末端保守结构域能够防止 P1 降解^[24], 而 P1 或 P2 中任一酸性核糖体蛋白降解, 另一个酸性核糖体蛋白也随之降解^[25], 继而影响核糖体的活性。酸性核糖体蛋白 P1、P2 的磷酸化和去磷酸化修饰的相互协调作用, 对调控核糖体的活性具有重要意义, 而浆蜂要分泌大量的王浆, 其咽下腺较高合成王浆蛋白的活性可能就是通过调节这些磷酸化的核糖体蛋白来实现的。

60S 核糖体蛋白 L15 是核糖体大亚基的组成蛋白, 参与核糖体大亚基的装配过程^[26], 有利于促进核糖体活性颗粒的形成^[27], 而其磷酸化修饰可能会影响核糖体装配时蛋白之间的相互作用, 进而影响核糖体的装配速度^[28]。同时 L15 对肽基转移酶的活性也具有重要作用^[29], 肽基转移酶在肽链延伸过程中催化肽键的形成, 而其活性的高低直接影响蛋白的合成效率。因为浆蜂咽下腺需要合成大量的王浆蛋白, 因此磷酸化的 60S 核糖体蛋白 L15 可能在提高咽下腺王浆蛋白的合成效率方面发挥重要作用。

翻译后修饰对调节蛋白活性的功能具有重要影响, 细胞内蛋白通常以没有活性的前体形式存在, 这些无活性的前提蛋白只有经过加工和修饰才能转变为具有生物学功能的活性蛋白, 参与生物的各项生命活动^[7]。王浆蛋白 1 和 7 前体是王浆蛋白 1 和 7 在咽下腺细胞内是无活性的, 但当它们从咽下腺分泌出来时经磷酸化修饰就可能转变成具有生物活性的王浆蛋白。王浆蛋白 1 是王浆的主要营养成分, 占王浆可溶性蛋白的 48%, 研究已表明浆蜂与意蜂王浆的功能蛋白质无显著差异, 而其磷酸化修饰增加了王浆蛋白的钙磷比, 可提高王浆的营养功能^[30], 除此之外, 它还可以促进蜜蜂脑细胞的增殖^[31-32], 与王浆蛋白 7 共同参与蜜蜂的级型分化^[33-35], 因此, 王浆蛋白 1 和 7 的磷酸化修饰对满足蜂王产卵和幼蜂快速发育的营养需要具有重要意义。由于浆蜂王浆分泌量的增加, 必须有相应的生物补偿机制来保证其所产王浆蛋白质组的稳定性, 而磷酸化修饰可能在此发挥了重要的作用,

这与磷酸化修饰可改变蛋白质的溶解性功能活性相一致^[36]。

4 结论

通过对浆蜂哺育蜂咽下腺磷酸化蛋白质组研究, 发现蛋白磷酸化修饰主要发生在与王浆蛋白合成相关的核糖体蛋白及王浆主蛋白家族上。核糖体的磷酸化修饰参与调节核糖体活性及蛋白合成过程, 保证咽下腺王浆蛋白翻译过程的有序高效进行。而磷酸化王浆蛋白 1 和 7 可有效的提高王浆蛋白的活性进而保证产量的提高。这为进一步在磷酸化修饰水平上与意蜂进行磷酸化蛋白质组的差异分析, 进而阐明浆蜂王浆的高产机制奠定了理论基础。

References

- [1] Huang Z Y, Otis G W, Teal P E A. Nature of brood signal activating the protein synthesis of hypopharyngeal gland in honey bees, *Apis mellifera* (Apidae: Hymenoptera). *Apidologie*, 1989, 20(6): 455-464.
- [2] Evans J D, Wheeler D E. Differential gene expression between developing queens and workers in the honey bee, *Apis mellifera*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(10): 5575-5580.
- [3] Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Álvarez J. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *Journal of Food Science*, 2008, 73(9): R117-R124.
- [4] 李建科, 陈盛禄, 钟伯雄, 苏松坤. 西方蜜蜂咽下腺与繁殖力的发育遗传研究. *中国畜牧杂志*, 2003, 39(6): 9-11.
Li J K, Chen S L, Zhong B X, Su S K. Genetic analyses for developmental behavior of reproductive ability and hypopharyngeal gland in Western honeybees (*Apis mellifera* L.). *Chinese Journal of Animal Science*, 2003, 39(6): 9-11. (in Chinese)
- [5] 胡福良, 陈盛禄, 林雪珍, 苏松坤, 杜芝兰. 意大利蜂工蜂咽下腺细胞超微结构与分泌活性. *浙江农业大学学报*, 1997, 23(1): 75-80.
Hu F L, Chen S L, Lin X Z, Su S K, Du Z L. Study on the ultrastructure of hypopharyngeal gland cells and secretory activity of worker honey bee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Zhejiang Agricultural University*, 1997, 23(1): 75-80. (in Chinese)
- [6] 冯毛, 李建科. 王浆高产蜜蜂和原种意大利蜜蜂咽下腺发育蛋白质组分析. *中国农业科学*, 2009, 42(2): 677-687.
Feng M, Li J K. Proteome analysis of the development of hypopharyngeal gland of high royal jelly producing bees and native

- Italian bees. *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, 42(2): 677-687. (in Chinese)
- [7] Mann M, Jensen O N. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(3): 255-261.
- [8] Li J K, Feng M, Begna D, Fang Y, Zheng A J. Proteome comparison of hypopharyngeal gland development between Italian and royal jelly producing worker honeybees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Proteome Research*, 2010, 9(12): 6578-6594.
- [9] Li J K, Wang T, Zhang Z H, Pan Y H. Proteomic analysis of royal jelly from three strains of Western honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(21): 8411-8422.
- [10] Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Osterman A, Godzik A, Hunter T, Dixon J, Mustelin T. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell*, 2004, 117(6): 699-711.
- [11] Zolnierowicz S, Bollen M. Protein phosphorylation and protein phosphatases. *The EMBO Journal*, 2000, 19(4): 483-488.
- [12] Porath J. IMAC-immobilized metal ion affinity based chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 1988, 7(7): 254-259.
- [13] Thingholm T E, Jensen O N, Larsen M R. Analytical strategies for phosphoproteomics. *Proteomics*, 2009, 9(6): 1451-1468.
- [14] 张兰, 李建科, 吴黎明. 王浆高产蜜蜂 (*Apis mellifera* L.) 卵期发育蛋白质组学分析. *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)
- [15] Knecht D, Kaatz H H. Patterns of larval food production by hypopharyngeal glands in adult worker honey bees. *Apidologie*, 1990, 21(5): 457-468.
- [16] Liljas A, Gudkov A T. The structure and dynamics of ribosomal protein L12. *Biochimie*, 1987, 69(10): 1043-1047.
- [17] Uchiumi T, Kominami R. Binding of mammalian ribosomal protein complex P0·P1·P2 and protein L12 to the GTPase-associated domain of 28 S ribosomal RNA and effect on the accessibility to anti-28 S RNA autoantibody. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(6): 3302-3308.
- [18] Uchiumi T, Honma S, Nomura T, Dabbs E R, Hachimori A. Translation elongation by a hybrid ribosome in which proteins at the GTPase center of the *Escherichia coli* ribosome are replaced with rat counterparts. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(6): 3857-3862.
- [19] Santos C, Ballesta J P. Ribosomal protein P0, contrary to phosphoproteins P1 and P2, is required for ribosome activity and *Saccharomyces cerevisiae* viability. *The Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(22): 15689-15696.
- [20] Hamel E, Koka M, Nakamoto T. Requirement of an *Escherichia coli* 50 S ribosomal protein component for effective interaction of the ribosome with T and G factors and with guanosine triphosphate. *The Journal of Biological Chemistry*, 1972, 247(3): 805-814.
- [21] Hamman B D, Oleinikov A V, Jokhadze G G, Traut R R, Jameson D M. Rotational and conformational dynamics of *Escherichia coli* ribosomal protein L7/L12. *Biochemistry*, 1996, 35(51): 16672-16679.
- [22] Santos C, Ballesta J P. The highly conserved protein P0 carboxyl end is essential for ribosome activity only in the absence of proteins P1 and P2. *The Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(35): 20608-20614.
- [23] Saenz-Robles M T, Remacha M, Vilella M D, Zinker S, Ballesta J P. The acidic ribosomal proteins as regulators of the eukaryotic ribosomal activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1990, 1050(1): 51-55.
- [24] Nusspaumer G, Remacha M, Ballesta J P. Phosphorylation and N-terminal region of yeast ribosomal protein P1 mediate its degradation, which is prevented by protein P2. *The EMBO Journal*, 2000, 19(22): 6075-6084.
- [25] Remacha M, Santos C, Bermejo B, Naranda T, Ballesta J. Stable binding of the eukaryotic acidic phosphoproteins to the ribosome is not an absolute requirement for in vivo protein synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267(17): 12061-12067.
- [26] Lieberman K R, Noller H F. Ribosomal protein L15 as a probe of 50 S ribosomal subunit structure. *Journal of Molecular Biology*, 1998, 284(5): 1367-1378.
- [27] Franceschi F J, Nierhaus K H. Ribosomal proteins L15 and L16 are mere late assembly proteins of the large ribosomal subunit. Analysis of an *Escherichia coli* mutant lacking L15. *The Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265(27): 16676-16682.
- [28] Soung G Y, Miller J L, Koc H, Koc E C. Comprehensive analysis of phosphorylated proteins of *Escherichia coli* ribosomes. *Journal of Proteome Research*, 2009, 8(7): 3390-3402.
- [29] Hill W E. *The Ribosome: Structure, Function, and Evolution*. American Society for Microbiology, 1990.
- [30] Graham J M, Ambrose J T, Langstroth L. *The Hive and the Honey Bee: A New Book on Beekeeping Which Continues the Tradition of "Langstroth on the Hive and the Honeybee"*. USA: Dadant, Hamilton, Ill., 1992.
- [31] Garcia L, Saraiva Garcia C H, Calábria L K, da Cruz G C N, Sánchez Puentes A, Bão S N, Fontes W, Ricart C A, Salmen Espindola F,

- Valle de Sousa M. Proteomic analysis of honey bee brain upon ontogenetic and behavioral development. *Journal of Proteome Research*, 2009, 8(3): 1464-1473.
- [32] Tamura S, Amano S, Kono T, Kondoh J, Yamaguchi K, Kobayashi S, Ayabe T, Moriyama T. Molecular characteristics and physiological functions of major royal jelly protein 1 oligomer. *Proteomics*, 2009, 9(24): 5534-5543.
- [33] Kamakura M. Royalactin induces queen differentiation in honeybees. *Nature*, 2011, 473(7348): 478-483.
- [34] Schmitzova J, Klaudiny J, Albert Š, Schröder W, Schreckengost W, Hanes J, Judova J, Šimúth J. A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1998, 54(9): 1020-1030.
- [35] Thompson G J, Kucharski R, Maleszka R, Oldroyd B P. Towards a molecular definition of worker sterility: differential gene expression and reproductive plasticity in honey bees. *Insect Molecular Biology*, 2006, 15(5): 537-644.
- [36] Birrell G W, Earl S T, Wallis T P, Masci P P, de Jersey J, Gorman J J, Lavin M F. The diversity of bioactive proteins in Australian snake venoms. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2007, 6(6): 973-986.

(责任编辑 岳梅)