

# 不同贮存温度下茶花蜂花粉 蛋白质组的初步研究

胡若洋<sup>1,2</sup>, 冯毛<sup>1</sup>, 李建科<sup>1,\*</sup>

(1. 中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100093

2. 首都师范大学生命科学学院, 北京 100037)

**摘要:** 采用蛋白质组双向电泳技术, 对室温及 -20℃ 贮存6个月的茶花蜂花粉蛋白质组差异进行了比较。结果表明, 室温贮存6个月的茶花蜂花粉总蛋白质为261个, -20℃ 贮存6个月的茶花蜂花粉总蛋白质为396个, 室温贮存6个月的茶花蜂花粉蛋白质较-20℃ 贮存6个月的茶花蜂花粉蛋白质数目明显减少, 说明室温贮存可能会引起茶花蜂花粉内蛋白质的损失。同时发现, 两种不同贮存条件下的茶花蜂花粉, 也存在着蛋白质丰度的差异, 其中24个蛋白质在室温贮存时丰度较大, 而在低温贮存条件下丰度较小; 112个蛋白质在室温贮存下丰度较小, 而在低温贮存下丰度较大。可见, 不同温度条件下贮存蜂花粉会对蛋白质种类及丰度均产生较大影响。冷冻贮存蜂花粉是一种比较好的贮存方法。

**关键词:** 茶花蜂花粉; 贮存温度; 蛋白质组; 双向凝胶电泳

Preliminary Study on Proteome of Honeybee Pollen of *Camellia sinensis* at Different Storage Temperatures

HU Ruo-yang<sup>1,2</sup>, FENG Mao<sup>1</sup>, LI Jian-ke<sup>1,\*</sup>

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

2. College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100037, China)

**Abstract:** To better understand the molecular mechanism of honeybee pollen at the protein level during storage, two-dimensional gel electrophoresis technology was used to investigate honeybee pollen of *Camellia sinensis* stored at room temperature and at -20℃ for 6 months respectively. Result showed that 261 protein spots are separated from honeybee pollen stored at room temperature, while 396 protein spots are detected from honeybee pollen stored at -20℃. The reducing number of total proteins in honeybee pollen stored at room temperature is less than that at -20℃. Moreover, results indicated that storage of honeybee pollen at room temperature might cause protein degradation. Simultaneously, the abundance of certain protein is different at different storage temperatures. 24 proteins abundances are higher in honeybee pollen stored at room temperature than that at -20℃. Furthermore, 112 protein spots show lower abundance in honeybee pollen stored at room temperature than that at -20℃. Results indicated that protein and protein abundance might be affected by storage temperature. honeybee pollen storing at -20℃ is probably a better storage method to maintain its quality.

**Key words:** honeybee pollen of *Camellia sinensis*; two-dimensional gel electrophoresis; proteome; storage temperature

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)06-0438-06

蜂花粉是工蜂从蜜源植物的花药中采集的花粉粒, 并混入花蜜和唾液, 以使花粉粘集成团, 加工成不规则的扁圆形颗粒, 即形成花粉团<sup>[1]</sup>。蜂花粉的成分很复杂, 不但含有人体必需的蛋白质、脂类、碳水化合物、

各种维生素和微量元素, 还含有对人体生理机能有特殊功效的黄酮类、核酸、天然植物激素、性激素和促性腺激素等多种生物活性物质, 是名副其实的微型营养库<sup>[2-3]</sup>。它具有抑制前列腺增生、预防心血管疾病、调节

收稿日期: 2007-06-13

基金项目: “十一·五”国家科技支撑计划重点项目(2006BAD06B04; 2006BAD12B08);

中国农业科学院杰出人才课题启动基金项目

作者简介: 胡若洋(1985-), 男, 本科, 研究方向为蜜蜂发育及蜂产品蛋白质组学。E-mail: apislijik@126.com

\* 通讯作者: 李建科(1962-), 男, 教授, 博士, 研究方向为蜜蜂生物技术。E-mail: apislijik@126.com

血糖、促进造血、调节体内代谢和内分泌等诸多功能<sup>[4-5]</sup>。随着各种分离分析技术的进步,花粉化学成分的研究引起众多科研工作者的兴趣。目前国外研究主要集中于花粉中的过敏成分或者用于考古方面的研究<sup>[6-12]</sup>,国内对花粉的研究范围较广,更多是对花粉功效成分的研究。

天然蜂花粉含有22种氨基酸,其中人体必需的8种氨基酸含量高于蜂王浆的5~8倍,含有10多种维生素和20多种微量元素,100多种活性酶及具有抗癌作用的花粉多糖、胡萝卜素<sup>[13]</sup>。Almeida-Muradian等<sup>[3]</sup>对从巴西南部地区采集的10种不同颜色的干燥花粉粒中水分、灰分、脂类、蛋白质、类胡萝卜素、 $\beta$ -胡萝卜素、VC进行了分析,发现平均水分7.4%,蛋白质20%,脂类6%,灰分2.2%。Roma R B等<sup>[14]</sup>对桉树的蜂花粉成分及含量进行了测定,发现澳大利亚西部地区两种主要桉树蜂花粉蛋白质含量分别为20.6%、27.9%,纤维素含量分别为15.9%、6.9%,灰分含量分别为2.2%、2.3%,糖类含量分别为57.6%、56.8%,脂类在两种桉树蜂花粉中的含量极低,分别为0.8%、1.0%。尹蓉等<sup>[15]</sup>采用Sephadex G-25、Sephadex G-75柱色谱和SDS-PAGE凝胶电泳的方法分离纯化得到法国梧桐花粉中的蛋白质。刘剑秋等<sup>[16]</sup>对杨梅蜂花粉的营养成分进行了分析,发现其蛋白质含量为23.46%,可溶性糖含量为21.88%。苏松坤等<sup>[17]</sup>研究了新鲜茶花粉、新鲜蚕豆花粉、商品茶花粉和蜂粮中SOD活性,发现新鲜茶花粉SOD活性最高,其次是蜂粮中,商品茶花粉中的SOD活性,蚕豆花粉中SOD活性最低。

天然蜂花粉贮存条件非常严格,一般要求在冷库中保存。但由于流通、待售都在常温下进行,导致蜂花粉营养成分的破坏和流失。前人尽管对蜂花粉的化学组成及各组分在贮存过程中的变化进行了研究<sup>[18-19]</sup>,但是对不同贮存条件下的蜂花粉总蛋白质进行差异分析,却鲜见报道。本研究利用蛋白质组学双向电泳技术,对室温及低温贮存条件下的蜂花粉蛋白质组进行比较,以期探明不同贮存条件对蜂花粉蛋白成分的影响,为进一步开发利用蜂花粉提供科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

茶花粉样品取自浙江新昌一养蜂场。新鲜花粉从蜂箱巢门脱掉后立即进行干燥,干燥的新鲜茶花粉用干燥的密封塑料袋装好后,排挤空气封口,分别存放在室温条件下及-20℃冷冻条件下6个月贮存。

### 1.2 试 剂

固相pH梯度(IPG)胶条(pH3~10线性)、双向凝胶电泳(2-DE)蛋白分子量标准、Bio-lyte(pH3~10)、矿物油 伯乐公司;Tris碱、过硫酸铵(AP)、十二烷基硫

酸钠(SDS)、甘氨酸、TEMED、Sigma公司;丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、溴酚兰、考马斯亮兰(CBB)G-250、硫脲、CHAPS、甘油、牛血清白蛋白(BSA)Amresco公司;低熔点琼脂糖、尿素 Solarbio公司;DTT、碘乙酰胺 Merk公司;其余化学试剂 北京化学试剂公司。

### 1.3 仪 器

Microfuge 22R离心机 Beckman公司;Portein IEF Cell等电聚焦仪、SDSRAGE凝胶电泳仪 Bid-Rad Hercules公司;Z320凝胶扫描仪 北大方正公司。

### 1.4 方 法

#### 1.4.1 蛋 白 质 提 取

蛋白提取方法参考钟伯雄等<sup>[20]</sup>报道的方法并稍作改良。称取室温贮存6个月的蜂花粉以及-20℃贮存6个月的蜂花粉各5g分别置于冰上预冷的研钵中,冰上研磨至粉末状,Eppendorf管50mg/管分装,-20℃保存备用。每1mg蜂花粉加入10 $\mu$ l磷酸缓冲液(pH7.6,含32.5mmol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、2.6mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、400mmol/L NaCl),冰上研磨50min,超声5min。然后4℃下12000 $\times$ g离心10min;接着4℃下15000 $\times$ g再离心10min。避开脂肪层吸取上清液放入另一Eppendorf管中,沉淀中按照每1mg蜂花粉加入2 $\mu$ l上述磷酸缓冲液,冰上研磨3min,超声1min,4℃下15000 $\times$ g离心10min。避开脂肪层吸取上清液与上步所得上清液合并,作为磷酸易溶性蛋白溶液备用。沉淀中按每1mg蜂花粉加入10 $\mu$ l蛋白裂解缓冲液(含8mol/L尿素、2mol/L硫脲、4%CHAPS、20mmol/L Tris碱、30mmol/L DTT、pH3~10 0.5% Bio-lyte),冰上研磨25min,超声3min。4℃下15000 $\times$ g离心10min。避开脂肪层吸取上清液作为磷酸难溶性蛋白溶液与上述磷酸易溶性蛋白溶液合并,沉淀弃去。在混合上清液中加入100% TCA使TCA终浓度达到10%,冰上静置10min,以沉淀蛋白并除去样品中的盐份。将此混合液4℃下15000 $\times$ g离心10min,重复离心2次。弃去上清液,沉淀中按每1mg蜂花粉加入4 $\mu$ l上述的蛋白裂解缓冲液,冰上研磨10min,超声3min,使混合液充分溶解,用2mol/L氢氧化钠调溶液pH至近中性,制成蛋白样品溶液,直接使用或是-70℃冷藏备用。

#### 1.4.2 蛋 白 质 浓 度 测 定

采用Bradford法<sup>[21]</sup>进行蛋白质浓度测定。以标准牛血清白蛋白(BSA)为标准,595nm波长处测定吸光度。本实验中标准曲线方程为:Y=9.65356X。

#### 1.4.3 双 向 电 泳 (2-DE) 分 析

##### 1.4.3.1 第 一 向 固 相 pH 梯 度 等 电 聚 焦

按Görg等<sup>[22]</sup>的方法和Bio-Rad等电聚焦系统指南进

行。蛋白样品溶液上样量 400  $\mu\text{g}$ ，上样体积 420  $\mu\text{l}$ 。

水化上样液分为两部分<sup>[22]</sup>：室温贮存 6 个月，37.3  $\mu\text{l}$  蛋白质样品提取液 + 62.7  $\mu\text{l}$  蛋白裂解缓冲液；-20 贮存 6 个月，30.3  $\mu\text{l}$  蛋白样品提取液 + 69.7  $\mu\text{l}$  蛋白裂解缓冲液。两种上样液分别与 400  $\mu\text{l}$  水化上样缓冲液(含 8 mol/L 尿素、2% CHAPS、0.001% 溴酚兰，45 mmol/L DTT、pH 3~10 0.2% Bio-lyte 充分混合。分别取此混合液 420  $\mu\text{l}$ (含蛋白质 400  $\mu\text{g}$ ) 加入 IPG strip 持胶槽，将 IPG 线性干胶条 pH3~10(171 mm  $\times$  3.3 mm  $\times$  0.5 mm) 去保护膜胶面朝下，轻轻置入持胶槽中，覆盖一层矿物油盖好持胶槽盖子，置于 Bio-Rad 等电聚焦仪的电极板上，在 18 按以下程序进行第一向等电聚焦：50V，主动水化 14h；250V，每次 30min 共两次线性除盐；1000V，60min 快速除盐；9000V，线性升压 5h；9000V，聚焦 60000V  $\cdot$  h。

#### 1.4.3.2 第二向垂直板 SDS-PAGE 电泳

第一向聚焦结束后，取出带样品的 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、pH 8.8 0.375 mol/L Tris-HCl、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  $\mu\text{l}$  2-DE 蛋白分子量标准加在胶条的酸性端，排净气泡，用 1% 琼脂糖凝胶封闭，15 循环水冷却，开始进行第二向 SDS-PAGE 电泳。第二向电泳采用 ROTEMAN xi Cell 进行(恒流 25 mA/gel)，直至溴酚兰到达胶底边缘。

#### 1.4.4 考马斯亮兰(CBB)染色

电泳结束后用 CBB G-250 进行凝胶染色。其基本过程依次是：40% 乙醇 + 10% 冰醋酸室温摇床固定 4h；0.1% CBB G-250 + 2% 磷酸 + 10% 硫酸铵 + 25% 甲醇室温摇床染色 14h；超纯水脱色至凝胶背景无色。

#### 1.4.5 图像分析及数据统计分析

染色后凝胶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)。双向凝胶电泳图谱达三次重复，实验结果具有较好的重复性，扫描图像使用 PDQuest 7.3.0 Build 059 软件，设置使用相同的参数(灵敏度 10.36、尺寸比例 7)进行分析，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，并用总密度方法标准化处理。各组蛋白质表达差异显著性用 SPSS 14.0 分析处理。

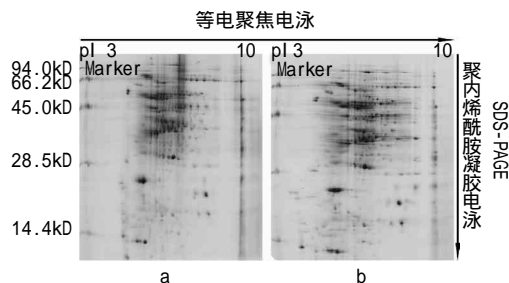
## 2 结果与分析

### 2.1 不同贮存条件下茶花蜂花粉蛋白质组双向凝胶电泳图谱分析

利用蛋白质组双向电泳技术获得了室温贮存 6 个月的蜂花粉和 -20 贮存 6 个月的蜂花粉蛋白差异表达图谱

(图 1)。从图 1 可以看出，不同贮存条件下的蜂花粉蛋白质分子量范围为 12.82~111.14 kD，等电点分布在 3.82~9.20 范围内，其中大部分蛋白质分布在分子量 20~100 kD、等电点偏酸性的 pI 4~8 之间。

### 2.2 不同贮存条件下茶花蜂花粉蛋白质组差异比较

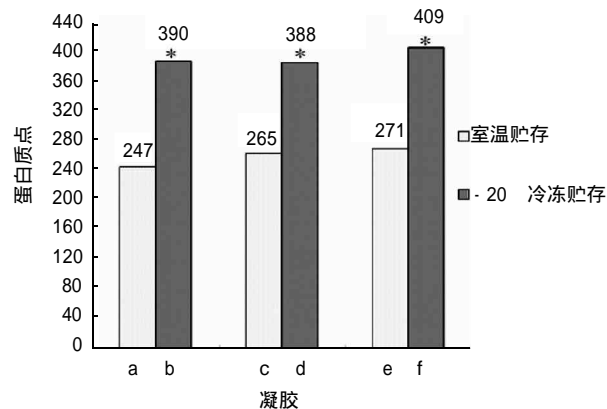


a. 室温贮存 6 个月；b. -20 贮存 6 个月。pI 等电点。

图 1 不同贮存温度下茶花蜂花粉蛋白质双向电泳图谱

Fig. 1 2-DE protein profiles of honeybee pollen at different storage temperatures

图谱分析表明，不同贮存条件下茶花蜂花粉总蛋白质组有较大的差异。其中，室温贮存 6 个月的茶花蜂花粉 261 个蛋白质。-20 贮存 6 个月的茶花蜂花粉 396 个蛋白质。二者比较，室温条件贮存的茶花蜂花粉蛋白质总数较低温条件下贮存的茶花蜂花粉蛋白质总数少 135 个，差异达极显著(图 2)。



\* 代表经统计验证不同贮存条件下样品蛋白质数目差异显著；a、c、e 代表室温贮存 6 个月；b、d、f 代表 -20 贮存 6 个月。

图 2 不同贮存温度下茶花蜂花粉蛋白质数目差异比较

Fig. 2 Comparison of protein spots from individual profiles of honeybee pollen at different storage temperatures

利用 PDQuest 7.3.0 软件对每个蛋白质点进行匹配和表达量分析，并计算出室温贮存的茶花蜂花粉每个点的表达量相对于 -20 贮存的茶花蜂花粉蛋白质点表达量的比值。经 Student's T-Test 统计检验发现，室温贮存的茶花蜂花粉和 -20 贮存的茶花蜂花粉总蛋白质的差

异点为136点(p < 0.05), 分布在分子量12.86~111.14kD、等电点4.20~9.15的范围内。其中点SSP23、SSP3210、SSP3317、SSP4006、SSP4116、SSP4117、SSP6106仅在室温贮存的茶花蜂花粉(表1)中出现, 分布在分子量14.02~43.52kD、等电点pI4.20~6.99的偏酸性范围内。而-20℃贮存的茶花蜂花粉出现的点为106个(表2), 其他23个点表现为丰度的差异(表3), 其中在贮存过程

表1 室温贮存条件下茶花蜂花粉特有蛋白质

Table 1 Unique proteins detected from honeybee pollen stored at room temperature

点编号	蛋白质点	分子量(kD)	等电点	蛋白丰度		
				常温贮存	-20	贮存
1	23	14.4	4.2	10154.8	-	-
2	3210	36.23	6.03	6004.9	-	-
3	3317	43.52	5.93	3161.8	-	-
4	4006	14.02	6.35	553.2	-	-
5	4116	29.13	6.42	2645.9	-	-
6	4117	27.95	6.49	859.7	-	-
7	6106	33.7	6.99	1002.2	-	-

注：“-”表示没有对应点。

表2 -20℃贮存条件下茶花蜂花粉特有蛋白质

Table 2 Unique proteins detected from honeybee pollen stored at -20

点编号	蛋白质点	分子量(kD)	等电点	蛋白丰度		
				常温贮存	-20	贮存
1	9	16.98	4.21	-	893.8	-
2	11	13.46	4.24	-	8807.5	-
3	15	22.03	4.53	-	1014.4	-
4	16	14.73	4.59	-	695	-
5	17	22.01	4.64	-	1130.6	-
6	20	20.17	4.89	-	544	-
7	1003	15.03	5.03	-	437	-
8	1013	15.03	5.39	-	348.6	-
9	1019	17.85	5.36	-	519	-
10	1105	33.47	5.22	-	715.3	-
11	1107	30.31	5.4	-	1549.2	-
12	1202	36.35	5.22	-	273.2	-
13	1205	36.28	5.34	-	943.6	-
14	1206	38.78	5.43	-	1101	-
15	1207	38.78	5.35	-	982.7	-
16	1208	38.68	5.26	-	678.9	-
17	1604	61.43	5.25	-	496.2	-
18	2011	12.86	5.71	-	3059.4	-
19	2012	23.85	5.72	-	1202	-
20	2013	16	5.75	-	1844	-
21	2103	34.68	5.73	-	892.8	-
22	2209	37.06	5.85	-	731.1	-
23	2211	38.16	5.81	-	674.7	-
24	2212	38.11	5.69	-	500.9	-
25	2314	39.7	5.82	-	972.1	-
26	2505	54.3	5.67	-	557.8	-
27	2512	54.05	5.72	-	1012.5	-
28	2704	69.26	5.56	-	2891.3	-

续表2

点编号	蛋白质点	分子量(kD)	等电点	蛋白丰度		
				常温贮存	-20	贮存
29	2706	73.51	5.76	-	1472.8	-
30	2812	97.33	5.76	-	2198	-
31	2814	83.08	5.62	-	1547.4	-
32	3006	17.4	6.1	-	616.7	-
33	3009	18.1	6.2	-	2104.2	-
34	3011	18.54	6.04	-	725.2	-
35	3105	34.66	5.95	-	768	-
36	3208	38.07	5.92	-	747.9	-
37	3209	35.78	5.9	-	6712.7	-
38	3308	38.41	6.15	-	1875	-
39	3309	40.35	6.18	-	6850.4	-
40	3310	41.95	6.21	-	344.4	-
41	3313	40.31	6.29	-	2078.4	-
42	3417	48.3	6.05	-	996.6	-
43	3621	57.21	6.28	-	643.2	-
44	4105	30.01	6.39	-	882.3	-
45	4110	34.44	6.49	-	525.4	-
46	4113	33.81	6.58	-	997.4	-
47	4205	36.5	6.48	-	2192.8	-
48	4207	35.5	6.49	-	649.2	-
49	4208	37.17	6.5	-	1459.3	-
50	4306	42.32	6.4	-	761.4	-
51	4308	38.65	6.43	-	893.1	-
52	4316	41.31	6.57	-	1075.1	-
53	4401	44.91	6.33	-	890.6	-
54	4405	48.62	6.41	-	1564.7	-
55	4502	49.79	6.36	-	3816.2	-
56	4604	58.45	6.38	-	1190.7	-
57	4707	66.92	6.49	-	942.5	-
58	4906	110.88	6.58	-	360	-
59	4907	110.62	6.53	-	485.1	-
60	4908	111.14	6.44	-	248.6	-
61	4909	111.13	6.38	-	311.1	-
62	5106	34.32	6.72	-	1212.3	-
63	5114	32.2	6.69	-	1218.1	-
64	5205	35.57	6.76	-	2348.5	-
65	5406	48.85	6.75	-	1410.3	-
66	5509	56.8	6.58	-	914.2	-
67	5604	56.65	6.69	-	1345.3	-
68	5807	94.59	6.64	-	6054.2	-
69	5904	110.26	6.83	-	427.3	-
70	5906	110.28	6.73	-	346.5	-
71	5908	110.66	6.65	-	425.5	-
72	6314	42.02	7.24	-	745.6	-
73	6514	50.18	7.3	-	1907.1	-
74	6516	56.36	7.35	-	3989.4	-
75	6802	98.83	7.01	-	807.1	-
76	6805	98.59	7.13	-	512.9	-
77	6806	98.69	7.2	-	843.3	-
78	6807	94.21	7.21	-	1423.2	-
79	6809	98.71	7.28	-	409.9	-
80	6810	93.13	7.33	-	3757.7	-
81	6901	99.59	6.9	-	243.6	-
82	6902	99.17	6.96	-	643.3	-
83	6903	99.17	7.06	-	740.7	-
84	7004	20.46	7.8	-	9935.8	-

续表 2

点编号	蛋白质点	分子量(kD)	等电点	蛋白丰度	
				常温贮存	-20 贮存
85	7210	36.6	7.63	-	4327.4
86	7306	39.19	7.54	-	1163.8
87	7310	38.12	7.65	-	1353
88	7404	47.72	7.39	-	2875
89	7514	52.01	7.67	-	2024.8
90	7801	98.3	7.37	-	1487
91	8001	15.59	7.88	-	573.5
92	8004	16.5	7.92	-	533
93	8007	23.97	8.36	-	1774.4
94	8105	30.95	8.37	-	1061.6
95	8107	27.57	8.45	-	4883.9
96	8110	27.63	8.56	-	1274.4
97	8114	27.62	8.33	-	1230.2
98	8209	37.34	8.43	-	9127.3
99	8310	42.62	8.37	-	1282.6
100	8705	73.48	8.02	-	2469.8
101	8711	66.49	8.46	-	3636.8
102	8801	94.48	7.91	-	2262
103	8802	93.51	8.02	-	1872.8
104	8803	93.44	8.13	-	272.4
105	9705	72.78	9.1	-	494.7
106	9706	73.5	9.15	-	839.8

注：“-”表示没有对应点。

表 3 不同贮存温度下茶花蜂花粉蛋白质丰度差异比较

Table 3 Comparison of protein abundances of honeybee pollen stored at different temperatures

点编号	蛋白质点	分子量(kD)	等电点	蛋白质丰度		比值*
				常温贮存	-20 贮存	
1	1007	16.06	5.28	418.6	1200.1	0.35
2	1014	23.13	5.41	32320.7	15904.5	2.03
3	1109	30.32	5.48	4682.9	3092.9	1.51
4	1511	53.66	5.48	1776.5	4782.7	0.37
5	2205	35.88	5.73	5934	3059.6	1.94
6	2403	44.97	5.66	2430.6	1240	1.96
7	3109	30.11	6.15	2326.6	6201.4	0.38
8	3620	64.02	6.1	2978.6	1718.9	1.73
9	4003	14.28	6.49	2124.4	3694.4	0.58
10	4103	29.41	6.36	8647	3379.3	2.56
11	4115	27.82	6.35	1246.3	529.6	2.35
12	4504	54.04	6.42	2790.3	4116	0.68
13	5108	32.65	6.79	980.1	1832.1	0.53
14	5312	38.9	6.87	3520.5	1946.9	1.81
15	5702	68.51	6.69	3414.7	1006.9	3.39
16	5706	67.98	6.83	4362.7	1811.9	2.41
17	6701	74.26	6.94	1081.7	550.4	1.97
18	6704	73.82	7.04	1786.3	858.1	2.08
19	6707	67.01	7.17	8811.5	5314.2	1.66
20	7003	20.91	7.79	26614.7	12638.3	2.11
21	8704	67.28	7.89	8387.2	2360.5	3.55
22	8708	67.13	8.2	5941	1390.9	4.27
23	9703	66.31	9.1	16736.9	7412.3	2.26

注：\* 比值是指常温贮存条件下的蛋白丰度与 -20 贮存时的蛋白质丰度的比值。

中上调表达的蛋白质点有 17 个,分布在分子量 20.91 ~ 74.26kD、等电点 5.41 ~ 9.10 的范围内,剩余 6 个点为下调表达,分布在分子量 14.28 ~ 54.04kD、等电点 5.28 ~ 6.79 的偏酸性范围内。

### 3 讨论

双向电泳技术作为蛋白质组学核心技术之一,已经越来越广泛地应用于蜜蜂蛋白质分析中。近年来,在蜜蜂蛋白质组学领域已开展了大量的研究工作,系统地研究了蜜蜂生活史不同阶段(如卵期<sup>[23]</sup>、幼虫期<sup>[24]</sup>等)、不同组织或器官(如咽下腺<sup>[25]</sup>、毒腺<sup>[26]</sup>)、以及不同腺体的分泌物(如王浆<sup>[27-29]</sup>、蜂毒<sup>[26]</sup>等)的蛋白质组。但是目前对蜂花粉的活性成分研究还处于初始阶段,许多问题还未开展研究。

本实验利用双向电泳技术对不同贮存条件下茶花蜂花粉总蛋白质组进行了研究,找到了不同贮存条件下蜂花粉的大量差异蛋白,为深入了解贮存过程中蜂花粉生物活性成分的变化打下了良好的基础。但是,本实验仅仅获得了不同贮存温度下的差异蛋白质的初步信息,差异蛋白质的结构和功能以及它们与蜂花粉贮存过程中其它生物活性物质变化的关系,还有待进一步研究。

本实验通过比较室温和 -20 贮存 6 个月的茶花蜂花粉蛋白质双向电泳图谱发现,室温贮存 6 个月的茶花蜂花粉蛋白质较 -20 贮存 6 个月的茶花蜂花粉蛋白质数目明显减少,部分蛋白质含量下降,说明在室温贮存条件可能会引起茶花蜂花粉蛋白质的损失。另一方面,室温贮存的茶花蜂花粉相对于 -20 贮存的茶花蜂花粉,也出现一些特异的及丰度上升的蛋白质点。目前虽然还不清楚这些特异蛋白的种类及其功能,但是至少说明了它们在蜂花粉贮存过程中对生物活性的丧失起到某种作用。本实验条件下所获得的在 -20 贮存 6 个月茶花蜂花粉的特异蛋白 106 个,室温贮存条件下特有蛋白 7 个,这些特异蛋白也许可以作为评定蜂花粉新鲜程度的指标。利用特异蛋白质组图谱差异作为评定蜂花粉新鲜度指标的研究目前尚未见报道。

一般情况下,温度越高生物有机体的生理代谢活动越强,而低温能有效地抑制各种代谢活动的进行。温度之所以能影响呼吸作用,主要是因为它能影响呼吸酶的活性。一般来说,接近 0 时,呼吸进行得很慢;呼吸作用的最适温度是 25 ~ 35 ,最高温度是 35 ~ 45 。在某种情况下,当温度增高 10 时,呼吸作用增加到 2 ~ 2.5 倍<sup>[30]</sup>。本研究发现,在室温贮存条件下,茶花蜂花粉蛋白质总数明显少于低温贮存条件下的蛋白质总数,部分蛋白的丰度也较低温贮存时低,这可能是由于室温贮存时贮存温度较高,茶花蜂花粉各种生理代谢活动旺盛,呼吸作用强,产热多,蛋白质在贮存过程中逐步

降解,最终引起蛋白质种类和含量下降。本实验也发现了在室温贮存条件下茶花蜂花粉特有的7个蛋白点,这可能是贮存过程中的某些代谢活动需要一些特殊的酶或蛋白质的参与。具体何种酶以何种方式参与了蜂花粉贮存过程中的代谢活动,有待今后深入研究。

为探索不同贮存条件对蜂花粉蛋白质组的影响,今后可以将新鲜的蜂花粉、室温贮存一定时间的蜂花粉、低温贮存一定时间的蜂花粉蛋白质组进行比较,进而获得不同贮存条件下蜂花粉蛋白质组的变化,并进一步比较蜂花粉蛋白质对贮存温度的敏感性及对贮存时间的敏感性。同时,为了深入了解贮存过程中差异蛋白质结构和功能以及与蜂花粉生物活性物质变化的关系,今后可以利用质谱等技术对检测到的差异蛋白进行结构分析和功能验证。

#### 4 结 论

室温贮存6个月的茶花蜂花粉蛋白质数目较-20℃贮存6个月的茶花蜂花粉显著减少,两种不同贮存条件下的茶花蜂花粉也存在着蛋白质丰度的差异。研究认为,冷冻贮存茶花蜂花粉是一种较好的贮存方法。

#### 参考文献:

- [1] 颜伟玉, 陈亮. 蜂花粉干燥温度和时间对其活性和水分影响的初步研究[J]. 养蜂科技, 2006(3): 34-35.
- [2] KENNETH R M, MARIA C. 7-and 8-O-methylherbacetin-3-O-sophorosides from bee pollens and some structure / activity observations [J]. Phytochemistry, 1996, 43(4): 763-767.
- [3] ALMEIDA-MURADIAN L B, LUCILA C P, SIKVIA C, et al. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2005, 18: 105-111.
- [4] TAKESHI N, REIJI I, HACHIRO I, et al. Scavenging capacities of pollen extracts from *Cladonia ferus* on autoxidation, superoxide radicals, hydroxyl radicals and DPPH radicals[J]. Nutrition Research, 2002, 22: 519-526.
- [5] 翟凤国, 周福波, 付惠. 蜂花粉抗疲劳作用的实验研究[J]. 牡丹江医学院学报, 2004, 23(5): 810.
- [6] TSUYOSHI N, ETSUO Y, TERUO S. Purification of an actin-binding protein composed of 115-kD polypeptide from pollen tubes of lily[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998, 249: 61-65.
- [7] GONZALEZ M L, GALLEGU M T, BERRENS L. Extraordinary stability of IgE-binding parietariapollen allergens in relation to chemically bound flavonoids[J]. Molecular Immunology, 1996, 33(17/18): 1287-1293.
- [8] BERRENS L, CUADRA B, GALLEGU M T. Complement inactivation by allergenic plant pollen extracts[J]. Life Sciences, 1997, 60(17): 1497-1503.
- [9] LOADER N J, HEMMING D L. Preparation of pollen for stable carbon isotope analyses[J]. Chemical Geology, 2000, 165(3/4): 339-344.
- [10] PETRA S, VACLAV K, DUSAN K, et al. Analysis of liquid extracts from tree and grass pollens by capillary electrophoresis methods[J]. Journal of Chromatography B, 2004, 808(1): 117-123.
- [11] BRENDON M H, LARSON, SPENCER C H. A comparative analysis of pollen limitation in flowering plants[J]. Biological Journal of the Linnean Society, 2000, 69(18): 503-520.
- [12] PETERSEN A, DRESSELHAUS T, GROBE K, et al. Proteome analysis of maize pollen for allergy-relevant components[J]. Proteomics, 2006(6): 6317-6325.
- [13] 李建萍, 张小燕. 蜂花粉的营养价值及其花粉饮料的开发[J]. 食品研究与开发, 2003, 24(1): 65-66.
- [14] BELL R R, THORNER E J, SEET J L L, et al. Composition and protein quality of honeybee-collected pollen of *Eucalyptus marginata* and *Eucalyptus calophylla*[J]. The Journal of Nutrition, 1983, 113(12): 2479-2484.
- [15] 尹蓉, 郑艳, 龙如章. 法国梧桐花粉的部分纯化分析[J]. 华西医学, 1997, 18(8): 212-213.
- [16] 刘剑秋, 张清其, 吴文珊, 等. 杨梅蜂花粉营养成分分析[J]. 西南农业大学学报, 1998, 20(3): 231-234.
- [17] 苏松坤, 陈盛禄, 林雪珍, 等. 蜂花粉中抗氧化因子SOD的研究[J]. 中国养蜂, 1999, 50(1): 7-9.
- [18] 高慧娟, 余春涛. 蜂花粉的化学组成及贮存过程中的变化[J]. 分析与检测, 2006, 32(12): 131-133.
- [19] 王永胜, 于殿华, 王进洲. 不同方法贮存的蜂花粉活性测定试验报告[J]. 养蜂科技, 1999(2): 2-3.
- [20] ZHONG B X, LI J K, LIN J R, et al. Possible effect of 30K proteins in embryonic development of silkworm *Bombyx mori*[J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2005, 37(5): 355-361.
- [21] 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.
- [22] GORG A, OBERMAIER C, BOGUTH G, et al. Recent developments in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients: Wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures[J]. Electrophoresis, 1999, 20(4/5): 712-717.
- [23] FLEIG R, WALLDORF U, GEHRING W J, et al. Development of the deformed protein in the embryo of the honeybee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera)[J]. Development Genes and Evolution, 1992, 201(4): 235-242.
- [24] CORONA M, ESTRADA E, ZURITA M. Between queens and workers during caste determination in the honeybee *Apis mellifera*[J]. The Journal of Experimental Biology, 1999, 202: 929-938.
- [25] SANTOS K S, DOS-SANTOS L D, MENDES M A, et al. Profiling the proteome complement of the secretion from hypopharyngeal gland of Africanized nurse-honeybees (*Apis mellifera*) [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2005, 35(1): 85-91.
- [26] PEIRENA N, VANROBAEYSB F, DEVREESE B, et al. The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2005, 1752(1): 1-5.
- [27] SCARSELLI R, DONADIO E, GIUFREDA M G, et al. Towards royal jelly proteome[J]. Proteomics, 2005, 5(3): 769-776.
- [28] SANO O, KUNIKATA T, KOHNO K, et al. Characterization of royal jelly proteins in both Africanized and European honeybees (*Apis mellifera*) by two-dimensional gel electrophoresis[J]. Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(1): 15-20.
- [29] LI J K, WANG T, PENG W J. Comparative analysis of the effects of different storage conditions on major royal jelly proteins[J]. Journal of Apicultural Research, 2007, 46(2): 73-81.
- [30] 潘瑞斌, 王小青, 李娘辉, 等. 植物生理学[M]. 5版. 北京: 高等教育出版社, 2004: 120-122.