

意蜂三型蜂间哺育王浆蛋白组分差异的研究

刘祥伟

(黑龙江省农业科学院 牡丹江分院,黑龙江 牡丹江 157041)

摘要:为研究蜜蜂三型蜂幼虫期间食物的差异,现对意大利蜜蜂三型蜂间哺育王浆蛋白组分的差异性进行研究。对工蜂幼虫哺育浆、雄蜂幼虫哺育浆、蜂王幼虫哺育浆分别用水和磷酸缓冲液进行提取,利用聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。结果表明:工蜂和雄蜂各日龄幼虫哺育浆间存在不同程度的差异;各个日龄蜂王幼虫哺育浆的蛋白质谱带基本相同;哺育浆分别经水和磷酸缓冲液提取,结果存在差异。

关键词:意大利蜜蜂;蜂王浆;聚丙烯酰胺凝胶电泳;蛋白质

中图分类号:S896.3

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2012)01-0060-04

蜂王浆(Royal Jelly)成分因产地、蜂种和取浆时间的不同,存在一定的差异^[1]。蜂王浆又称蜂乳,系蜜蜂5~15日龄工蜂咽下腺分泌的乳白色或淡黄色粘稠浆物,pH3.5~4.5,它是蜜蜂饲养蜂王和幼龄幼虫的主要食物。蜂王浆的化学成分极其复杂,从3~4日的王胎里所取出的蜂王浆大致含有水分66.00%、蛋白质12.00%、总类脂物6.00%、总原物质12.49%、灰分(矿物)0.82%、未确定物质还有2.84%^[2]。

蜂王浆中的蛋白质约占干物质的50%,其中2/3为清蛋白,1/3为球蛋白^[3]。Stefan Albert等发现MRJP3在SDS-凝胶电泳中表现出多态现象,并证明了分子量为60~70 kD的蛋白质是MRJP3的变体,MRJP3蛋白的多态性为确定蜜蜂个体基因型提供了一种简单易行的新方法^[4]。

Takenaka等研究了蜂王浆中主要蛋白质及氮的分布状况和性质,得出89%为水溶性含氮化合物,11%为水不溶性含氮化合物。另外,从水溶性蛋白质中还分离出5种多肽。Otani Hajime等用凝胶电泳法测定出蜂王浆中至少有6~9种蛋白质谱带,并测得主要蛋白质的分子量为45、54和62 kD。Osman从王浆中分离出8个明显的蛋白质单一成分带,并证明蜂王浆中含有8种人体必需氨基酸,游离氨基酸中脯氨酸和赖氨酸含量最多^[5]。Fujiwara等从蜂王浆水溶性成分中分离并纯化了一个活性肽^[6]。

在研究王浆蛋白多态型的问题时,许多的工作都是以采集的混合样品来进行的,无论是在蛋

白水平的研究,还是在如构建cDNA文库等DNA水平都是如此。事实上,王胎内的蜂王浆是由许多的适龄蜜蜂分泌的,这种多态型的来源是基于蜜蜂个体的差异抑或是蜜蜂本身个体都具有这种多态型的王浆蛋白的表达,即便是做了许多研究工作的意大利蜜蜂王浆蛋白也不十分清楚。该研究拟采用意大利蜜蜂为材料,用SDS-PAGE法分离意蜂三型蜂间的蜂王浆蛋白质并比较其组分的差异,为意大利蜜蜂王浆蛋白的研究和利用提供相关资料,同时研究的成果也可以丰富意蜂的生物学知识。

1 材料与方法

1.1 材料

供试哺育王浆为黑龙江省农业科学院牡丹江分院蜜蜂中心蜂场的幼虫哺育浆。供试药品有丙烯酰胺、双丙烯酰胺、十二烷基硫酸钠(以上均为国药集团化学试剂有限公司产品),考马斯亮蓝R-250和TRIS碱为Sangon公司产品,TEMED、过硫酸铵、溴酚蓝、甘油、甘氨酸、DTT和Marker为TaKaRa公司产品。还有磷酸缓冲液、蒸馏水、冰醋酸、甲醇和盐酸。所用仪器主要有离心管(1.5 mL)、TGL-16G型高速离心机、DYY-6C型稳压稳流电泳仪、DYCZ-24D型电泳槽、XW-80A旋涡混合器、pH仪(北京哈纳)、海尔冰箱、SPX智能型生化培养箱、JS-380A自动凝胶图像分析仪、Dragon-med微量移液器、STS-3型脱色摇床和Sangon生物冰。

1.2 方法

1.2.1 制备样品和上样 样品的制备有王浆和蛋白样品2种。

(1)王浆样品的制备。黑龙江省农业科学院牡丹江分院蜜蜂中心蜂场,选取一张卵脾,其中卵包括工蜂卵和雄蜂卵,卵孵化幼虫,工蜂取1~6日

收稿日期:2011-09-23

基金项目:现代农业产业技术体系(蜜蜂)资助项目(CARS-45-SYZ5)

作者简介:刘祥伟(1983-),男,山东省临沂市人,学士,研究实习员,从事蜂学研究。E-mail:laoniu_1107@163.com。

龄的哺育浆,雄蜂取 1~7 日龄的哺育浆。用镊子夹取幼虫,用微量移液器分别注水和磷酸缓冲液在巢房中充分溶解,再用微量移液器吸取溶解蜂王浆液,注入 Eppendorf 管,各取 5 份。带回实验室储存于冰箱中备用。用育王框培育蜂王,移取工蜂 3 日龄小幼虫,取 1~5 日龄蜂王幼虫的哺育浆,用镊子夹取幼虫,用微量移液器分别注水和磷酸缓冲液在巢房中充分溶解,再用微量移液器吸取溶解蜂王浆液,注入 Eppendorf 管,各取 5 份。带回实验室储存于冰箱中备用。

(2) 蛋白样品的制备。从冷冻室把意蜂三型蜂王浆样品取出,等待样品解冻,将样品原样用混合机混合,放入离心机离心 10 min, $10\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。离心后用微量移液器取上清液 40 μL 注入未用的 Eppendorf 管中,加入 5 \times 样品缓冲液 20 μL ,充分混合。煮沸 5 min,取出 Eppendorf 管放入生物冰中冷冻 10 min。再放入离心机中离心 10 min, $10\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。用微量移液器取上清液,视加样孔的大小而定上清液的移取量。用微量注射器将样品加入样品孔中。将蛋白质样品加入样品孔的底部,并随着染料水平的升高而调节注射器针头。避免带入气泡,气泡易使样品混入到相邻的加样孔中。

1.2.2 电泳 操作步骤:使电极插头与适当的电极相接,电流应向阳极,低压 30 min,染料迁移至 1.5 cm 时,高压调至 100 V,大约 90 min,然后关闭电源,从电极上拔掉电极插头,从电泳槽中取出凝胶玻璃板,小心移动两玻璃板之间的隔片,将其插入两玻璃板的一角。轻轻撬开玻璃板,凝胶会贴在其中一块板上。

1.2.3 染色 戴上手套避免将手指印留在电泳胶上,将胶移入干净的染色皿中。加入考马斯亮蓝染色剂,凝胶要全部浸泡于染色剂,用盖子密封,放在摇床上缓慢震荡。对于 0.75 mm 的凝胶,可在摇床上缓慢震荡 5~10 min,对于 1.5 mm 的凝胶,需 10~20 min。震荡一段时间后将以前的染色液弃去,倒入新染色液继续震荡,直至凝胶染好色。

1.2.4 脱色 将胶移入一个盛有少量考马斯亮蓝的容器中。对于 0.75 mm 的凝胶,可在摇床上缓慢震荡 5~10 min,对于 1.5 mm 的凝胶,需 10~20 min,在染色和脱色过程中要用盖子密封。弃去染液,将凝胶在水中漂洗数次。戴上手套避免将双手染色。加入考马斯亮蓝脱色液,清晰的条带很快会显示出来,大部分凝胶脱色需要 1 h,使用过的脱色液则可用清水冲洗掉。为了脱色完全,需数次更换脱色液并震荡过夜。

2 结果与分析

2.1 工蜂间的差异

意大利蜜蜂工蜂 1~6 日龄幼虫哺育浆经 PBS 提取,用 SDS-PAGE 电泳分析,总计分离出 7 条带,它们的分子量从大到小依次为 131、128、98、67、63、58 和 18 kD,其中分子量为 128 kD 的 1 条带分别标为 B 和 C 只在 4~6 日龄的哺育浆中存在;分子量为 18 kD 的 1 条带标为 D 只在 4 日龄的哺育浆中存在;分子量为 131、98、67、63 和 58 kD 的 5 条带在 1~6 日龄的哺育浆中均存在,其中分子量为 67 的组分在 1、2、3 和 5 日龄的含量较少,而在 4、6 日龄的相对较多。分子量为 98 kD 的组分只在 6 日龄的含量较多其它日龄含量较少。4 日龄幼虫王浆和 6 日龄幼虫王浆比 1~3 日龄幼虫王浆蛋白质含量要多,5 日龄幼虫王浆蛋白质含量最少(见图 1)。

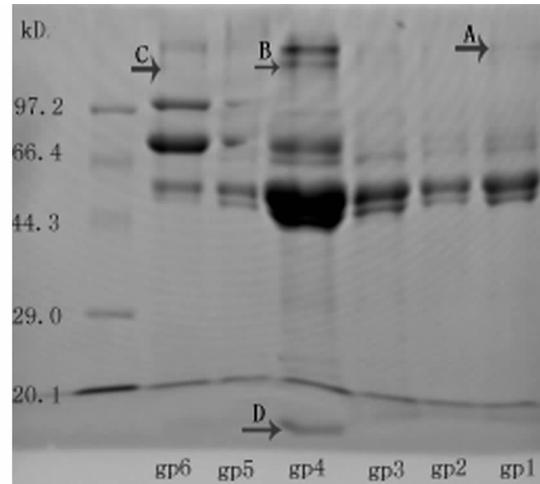


图 1 意蜂工蜂王浆蛋白 SDS-PAGE 图谱(PBS)

Fig. 1 The worker bees royal jelly protein SDS-PAGE map of *Apis mellifera ligustica* (PBS)

意大利蜜蜂工蜂 1~6 日龄幼虫哺育浆经水提取,用 SDS-PAGE 电泳分析,总计分离出 11 条带,它们的分子量从大到小依次为 98、85、79、66、57、49、35、31、27、25 和 22 kD,其中分子量为 98 kD 的 1 条带分别标为 A 和 B 只在 5 日龄和 6 日龄的哺育浆中存在,分子量为 22 kD 的 1 条带标为 C 只在 5 日龄的哺育浆中存在,其中分子量为 85、79、66、57、49、35、31、27 和 25 kD 的 9 条带在 1~6 日龄的哺育浆中均存在,1~4 日龄条带相对一致,分子量基本相同;5 日龄幼虫王浆蛋白质含量最多,6 日龄幼虫王浆蛋白质含量最少(见图 2)。

2.2 雄蜂间的差异

意大利蜜蜂雄蜂 1~7 日龄幼虫哺育浆经 PBS 提取,用 SDS-PAGE 电泳分析,总计分离出

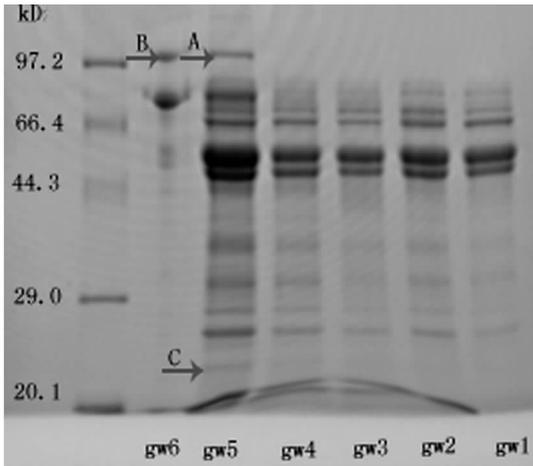


图2 意蜂工蜂王浆蛋白 SDS-PAGE 图谱(水)
Fig.2 The worker bees royal jelly protein SDS-PAGE map of *Apis mellifera ligustica* (water)

7条带,它们的分子量从大到小依次为 132、98、75、63、58、27 和 23 kD,其中分子量为 98 kD 的 1 条带只在 5~7 日龄的哺育浆中存在,分子量为 27 和 23 kD 2 条带分别标为 E 和 F 只在 5 日龄的哺育浆中存在,其中分子量为 132、75、63 和 58 kD 的 4 条带分别标为 A、B、C、D 在 1~7 日龄的哺育浆中都存在,分子量为 132 的组分在 1、3、4 和 6 日龄的含量较少,而在 2、5、7 日龄的相对较多。5 日龄幼虫王浆蛋白谱带最多 7 条,其蛋白质含量也是最多的;1 日龄和 6 日龄幼虫王浆蛋白质含量相对较少(见图 3)。

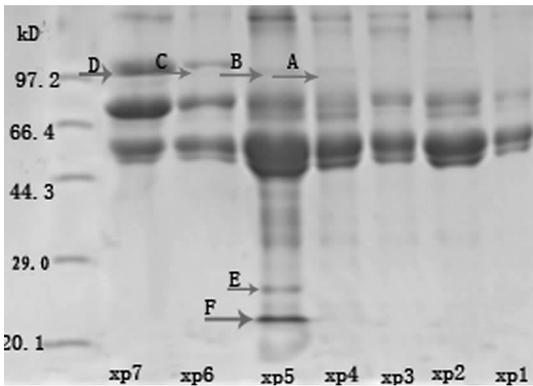


图3 意蜂雄蜂王浆蛋白 SDS-PAGE 图谱(PBS)
Fig.3 Drone royal jelly protein SDS-PAGE map of *Apis mellifera ligustica* (PBS)

意大利蜜蜂雄蜂 1~7 日龄幼虫哺育浆经水提取,用 SDS-PAGE 电泳分析,总计分离出 11 条带,它们的分子量从大到小依次为 98、85、79、67、57、49、35、31、27、25 和 21 kD,其中分子量为 98 kD 的 1 条带标为 A 只在 7 日龄的哺育浆中存在,其余 10 条带在 1~7 日龄的哺育浆中均存在,1、3、6 日龄幼虫王浆的蛋白质含量相对较少,2 日

龄幼虫王浆蛋白质含量最多(见图 4)。

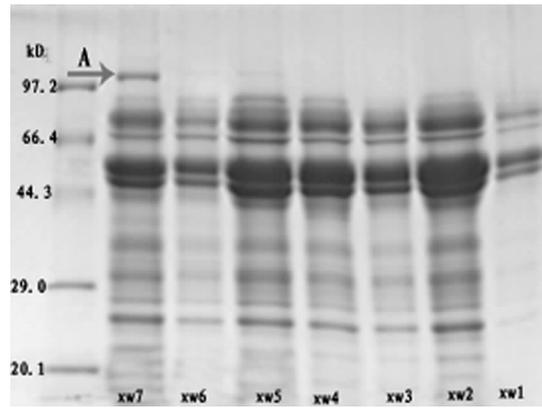


图4 意蜂雄蜂王浆蛋白 SDS-PAGE 图谱(水)
Fig.4 Drone royal jelly protein SDS-PAGE map of *Apis mellifera ligustica* (water)

2.3 蜂王间的差异

意大利蜜蜂蜂王 1~5 日龄幼虫哺育浆经 PBS 提取,用 SDS-PAGE 电泳分析,总计分离出 6 条带,它们的分子量从大到小依次为 132、81、75、65、59 和 26 kD,其中分子量为 132 kD 的 1 条带只在 4 日龄和 5 日龄的哺育浆中存在,其中分子量为 81、75、65、59 和 26 kD 的 5 条带在 1~5 日龄的哺育浆中都存在,分子量为 26 kD 的组分在 1~3 日龄的含量较少,而在 4~5 日龄的相对较多。4~5 日龄幼虫王浆蛋白质含量明显比 1~3 日龄幼虫王浆蛋白质组分含量多(见图 5)。

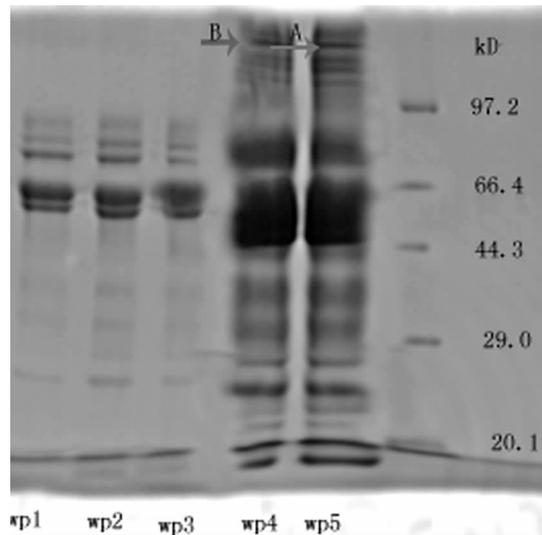


图5 意蜂蜂王王浆蛋白 SDS-PAGE 图谱(PBS)
Fig.5 Royal jelly protein SDS-PAGE map of *Apis mellifera ligustica* (PBS)

意大利蜜蜂蜂王 1~5 日龄幼虫哺育浆经水提取,用 SDS-PAGE 电泳分析,总计分离出 6 条带,它们的分子量从大到小依次为 132、83、75、

65、59 和 25 kD,其中分子量为 132、83、75、65 和 59 kD 的 5 条带在 1~5 日龄的哺育浆中均存在,分子量为 26 kD 的 1 条带在 4~5 日龄的哺育浆中都存在,分子量为 132 kD 的组分在 1~3 日龄的含量较少,而在 4~5 日龄的相对较多。4~5 日龄幼虫王浆蛋白质含量明显比 1~3 日龄幼虫王浆蛋白质组分含量多(见图 6)。

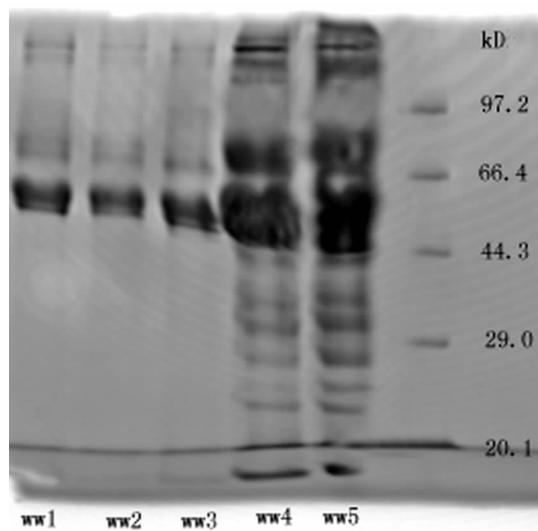


图 6 意蜂蜂王王浆蛋白 SDS-PAGE 图谱(水)
Fig. 6 Royal jelly protein SDS-PAGE map of *Apis mellifera ligustica* (water)

3 结论与讨论

3.1 工蜂、雄蜂各日龄王浆谱带不同

工蜂、雄蜂各日龄王浆谱带不同的原因可能是由于工蜂和雄蜂不同虫龄生长发育所需的营养成分不同,哺育蜂根据不同日龄的幼虫分泌不同成分的哺育浆,以及不同日龄的哺育蜂可能分泌的哺育浆成分也不同所造成的。工蜂和雄蜂各个日龄哺育王浆的蛋白质组分存在差异,1~3 日龄

的幼虫都是用蜂王浆饲喂的,4 日龄以后哺育蜂用蜂粮饲喂幼虫,因此工蜂、雄蜂各个日龄哺育王浆的蛋白质组分存在差异。

3.2 蜂王各日龄的王浆谱带没有明显差异

原因可能是因为蜂王哺育浆中的成分一直很稳定造成的,蜂王幼虫从 1~5 日龄一直都食用蜂王浆,虽然不同虫龄生长发育所需的营养成分可能不同,哺育蜂也可能会根据不同日龄的幼虫分泌不同成分的哺育浆,但蜂王一生都在食用蜂王浆,因此蜂王各日龄的王浆谱带没有太明显的差异。

3.3 PBS 与水溶样品存在差异

在取样过程中,由于样品量很少,一箱蜜蜂的幼虫哺育浆满足不了试验需要,所以取样的范围是同场多箱,这种取样的结果可能也会影响电泳带的成分,也存在同种不同群造成王浆成分的差异。

研究意蜂三型蜂间蜂王浆蛋白组分差异,能够为意大利蜜蜂王浆蛋白的相关研究和利用提供资料,研究的成果也可以丰富意蜂的生物学知识,同时对探讨王浆蛋白多态型在生物学上具有重要的意义。如果进一步研究的话,对从中发现新的蛋白组分会有一定的作用。

参考文献:

- [1] 陈崇羔,陈婉玉,龚蜜. 蜂王浆中水溶性蛋白质分子量的探讨[J]. 中国养蜂,1998(4):3-6.
- [2] 宋卫中,宋晓勇,刘蔚. 蜂王浆的研究和应用综述[J]. 中华实用中西医杂志,2005,18(6):917-919.
- [3] 朱黎. 蜂王浆中的蛋白质[J]. 蜜蜂杂志,2005(5):30-31.
- [4] 方国桢,方建生,田树革. 蜂王浆成分及其分析方法研究进展[J]. 中国乳品工业,1994(6):69.
- [5] 杨远帆,陈靖刚,倪辉. 蜂王浆中蛋白质及肽类物质的研究进展[J]. 中国养蜂,2004(4):27-28.
- [6] Fujiwara S, Imai J, Fujiwara M, et al. A potent antibacterial protein in royal jelly[J]. J. Biol. Chem, 1990, 265(19): 11333-11337.

Difference in Protein Composition of Breeding Jelly in *Apis mellifera ligustica*

LIU Xiang-wei

(Mudanjiang Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Mudanjiang, Heilongjiang 157041)

Abstract: In order to study the food difference between three types of bee during larva period, the difference of royal jelly protein component bred by three types of *Apis mellifera ligustica* were studied. The protein component of breeding jelly extracted by water and PBS, respectively from the worker, drone and queen of were analyzed by SDS-PAGE. The results showed that there were differences in protein components of jelly bred by various instars of worker and drone. The protein bands were no difference in jelly fed by various instars of queen. The protein bands were different in jelly extracted by water and PBS.

Key words: *Apis mellifera ligustica*; royal jelly; SDS-PAGE; protein composition