适合蜂王浆蛋白质组的双向电泳技术

赵方圆[1,2]，吴亚君[1]，韩建勋[1]，陈 颖[1,*]，葛毅强[2,3,*]
(1.中国检验检疫科学研究院，北京 100123；2.中国农业大学食品科学与营养工程学院，北京 100083；
3.中国农村技术开发中心，北京 100045)

摘 要：为建立适用于蜂王浆蛋白质组研究的双向电泳技术，对其中的IPG胶条的选择、蛋白质上样量、等电聚焦时间及SDS-PAGE凝胶浓度等关键步骤进行探索和优化。结果显示：蜂王浆蛋白质pH值主要分布在pH 5～8范围内，当上样量为150μg，聚焦时间达到32000V·h的情况下能充分地聚焦，第二向使用10%的梯度胶时获得的双向电泳图谱最佳，在优化后的蜂王浆双向电泳图谱上可检测到62±4蛋白点，重复性高，分辨率较好。优化后的双向电泳技术体系适合于蜂王浆全蛋白质的双向电泳分析。

关键词：蜂王浆；蛋白质组；双向电泳；优化

A Two-dimensional Gel Electrophoresis Protocol for Proteomic Study of Royal Jelly

ZHAO Fang-yuan[1,2]，WU Ya-jun[1]，HAN Jian-xun[1]，CHEN Ying[1,*]，GE Yi-qiang[2,3,*]
(1. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100123, China；
2. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China；
3. China Rural Technology Development Center, Beijing 100045, China)

Abstract：In order to establish a two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) protocol for proteomic study of royal jelly (RJ), IPG strip with appropriate pH range, optimal loading amount for protein, focusing time of IEF, and separating gel concentration was used. The results showed that the best 2-DE image of RJ proteins using IPG strip with pH 5—8, protein loading amount of 150 μg, focusing time of 32000 V•h, and separating gel concentration of 10% was achieved. Moreover, 62 ± 4 protein spots were detected on the gel with high repeatability and resolution. The 2-DE system after optimization is suitable for the analysis of RJ proteins, which provides theoretical basis for the proteomics of RJ.

Key words：royal Jelly (RJ)；proteomics；two-dimensional gel electrophoresis (2-DE)；optimization
中图分类号：TS201.6 文献标志码：A 文章编号：1002-6630(2013)09-0014-05
doi:10.7506/spkx1002-6630-201309004

蜂王浆(royal jelly，RJ)是由哺育蜂头部咽下腺和上鄂腺共同分泌的具有酸、涩、辣、甜并略带特殊芳香气味的乳白色或淡黄色的浆状物，它在蜜蜂的等级分化中发挥着重要的作用[1]。对于人类，蜂王浆具有抗癌、免疫调节、降血压、抗氧化抗菌等多种生理药理功能[2-5]，除了10-羟基-2-癸烯酸(10-hydroxy-2-decenoic acid，10-HDA)，蜂王浆蛋白在其中也发挥着极其重要的作用[6-7]。2006年西方蜜蜂基因组联盟完成了其全基因组测序和序列分析，王浆主蛋白(major royal jelly proteins，MRJPs)基因序列、蛋白功能已得到解析，使MRJPs成为近年来研究非常热门的营养蛋白[8]，基于双向电泳技术的蜂王浆蛋白质组学的研究国内外已有相关报道[9-13]。Sano等[9]利用双向凝胶电泳(two-dimensional gel electrophoresis，2-DE)技术研究了非洲蜜蜂及欧洲蜜蜂(意大利蜜蜂)所产蜂王浆的特性。Schonleben等[10]利用一维电泳、二维电泳及多维液相色谱一共鉴定出蜂王浆中含有20种不同的蛋白。国内李建科等[14]利用双向电泳、质谱等蛋白质组学研究方法对蜂王浆新鲜度、不同种蜜蜂产的蜂王浆蛋白质组[13]进行了研究。

2-DE是研究蛋白质组的重要技术之一，它的原理是首先根据蛋白质的等电点不同采用等电聚焦电泳(isoelectric focusing，IEF)分离蛋白质，然后再按蛋白质

收稿日期：2012-05-28
基金项目：国家“863”计划项目(2011AA1008047)
作者简介：赵方圆(1984—)，女，博士研究生，研究方向为食品品质与食品安全控制。E-mail：fangyuan5160@163.com
*通信作者：陈颖(1972—)，女，研究员，博士，研究方向为农产品质量安全与控制。E-mail：chenyingcaiq@163.com
葛毅强(1971—)，男，研究员，博士，研究方向为农产品加工与贮藏。E-mail：68511009@163.com

分子质量的不同利用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)将复杂蛋白混合物中的蛋白质在二维平面上分开。蛋白质组学技术作为前沿技术，在食品蛋白质研究中也得到越来越广泛的应用[15-18]。然而由于涉及的人工操作步骤多，实验周期长，即使是同一实验材料，采用不同的处理方法也会得到不同质量的实验结果。研究目的不同、样品不同，采用的双向电泳的规格与条件也不尽相同，主要表现在蛋白上样量的不同、胶条pH值范围的不同、聚焦条件的不同等方面。如蜂王浆的双向电泳研究大多采用pH 3～10的固相pH值梯度(immobilized pH gradient，IPG)胶条进行IEF[9-10]，但Furusawa等[11]采用pH 4～7的IPG胶条对蜂王浆蛋白质组有较好的分离。这说明了针对不同的蜂王浆样品，需要进行双向电泳条件的优化，从而获得最佳的分离效果。

中国是世界上蜂王浆生产量最大的国家[19]，蜂王浆质量问题已成为近年来蜂王浆产业关注的焦点，而蜂王浆中的蛋白质含量丰富，其种类及含量的变化都将引起蜂王浆质量的变化。前人[10-11]对蜂王浆蛋白质组的研究大都利用17cm或24cm规格的大型双向电泳凝胶，以达到对蜂王浆蛋白更全面的研究。但是大型胶电泳耗时长，实验难度大，所需要的试剂、仪器价格也相应提高。本研究的最终目的是将双向电泳技术作为一种检测手段来检测蜂王浆中蛋白的变化，为了缩短检测时间并降低操作难度，使该方法更加可行，采用了11cm的中型双向电泳凝胶，因而在IPG胶条的选择、上样量、聚焦时间及垂直胶浓度上都与大型胶有所不同。本研究的样品将选择具有代表性的蜂王浆样品，拟从第一向IPG胶条的选择、蛋白质上样量、聚焦时间和第二向胶浓度的选择等方面对蜂王浆蛋白质的双向电泳条件进行优化，建立适合大多数蜂王浆样品的双向电泳技术体系，以期为进一步研究蜂王浆蛋白质组提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 样品

蜂王浆样品由中国农业科学院蜜蜂研究所实验蜂场提供，为2011年5月采集的由意大利蜜蜂(*Apis mellifera* L.)生产的油菜浆。蜂王浆从台基中取出立即装入无菌Eppendorf管中，并冷藏于－80℃。

1.1.2 试剂

N,*N*,*N*',*N*'-四甲基乙二胺(TEMED)、矿物油、低熔点琼脂糖封胶液、碘乙酰胺、二硫苏糖醇(1,4-dithiothreitol，DTT)、3-[(3-胆固醇氨丙基)二甲基氨基]-1-丙磺酸(CHAPS)、考马斯亮蓝染色液(CBB)G-250美国Bio-Rad公司；硫脲 美国Sigma公司；尿素 美国Promega公司；过硫氨酸 国药集团化学试剂有限公司；SDS 美国Amresco公司；甘氨酸 美国 Novon公司。

裂解缓冲液：8mol/L尿素、2mol/L硫脲、4% CHAPS、20mmol/L Tris-base、30mmol/L DTT、2% Bio-Lyte)；水化上样缓冲液：8mol/L尿素、4% CHAPS、50mmol/L DTT、0.2% Bio-Lyte、0.001%溴酚蓝；SDS-PAGE：丙烯酰胺胶浓度分别为8%、10%、12%；胶条平衡缓冲液Ⅰ：6mol/L尿素、2% SDS、0.375mol/L Tris-HCl、20%甘油、2% DDT；胶条平衡缓冲液Ⅱ：6mol/L尿素、2% SDS、0.375mol/L Tris-HCl、20%甘油、2.5%碘乙酰胺；10×电泳缓冲液：25mmol/L Tris、192mmol/L甘氨酸、0.1% SDS，pH 8.3；固定液(甲醇、乙酸、水体积比5:1:4)均为本实验室配制；pH 3～10、pH5～8、pH 4～7 IPG预制胶条及对应两向电解质(pH 3～10、pH 5～8、pH4～7)、30%的丙烯酰胺溶液、1.5mol/L Tris-HCl(pH8.8)。

1.1.3 仪器与设备

PROTEAN IEF Cell水平电泳系统、Criterion中型垂直电泳槽、Versa-Doc MP 4000 Imaging System成像系统美国Bio-Rad公司。

1.2 方法

1.2.1 总蛋白的提取及蛋白的定量

蛋白提取方法根据Li Jianke等[14]报道的方法稍做改良，将100mg的蜂王浆和1mL的裂解缓冲液充分混合，4℃、15000×*g*离心10min。取上清液并分装于1.5mL离心管，每管100μL，然后加入3～5倍体积的丙酮(预先放置于－20℃)，冰浴30min后8000×*g*离心10min，去上清。待丙酮完全挥发后，沉淀用100μL的裂解缓冲液再次溶解。所得蛋白样品均采用Bradford法[20]进行浓度测定。

1.2.2 等电聚焦电泳

采用PROTEAN IEF Cell等电聚焦系统，11cm IPG预制胶条选择pH 3～10、5～8、4～7范围的胶条进行优化，每根胶条加350μL水化上样缓冲液，蛋白质上样量根据实验设计分别调整为50、150、250μg，聚焦温度为20℃，每根胶条的限制电流为50μA，等电聚焦设置参数如表1所示。

表1 等电聚焦参数的设定

Table 1 Parameter setting of IEF

步骤	电压/V	模式	时间
主动水化	50		12h
除盐	250	线性	30min
除盐	1000	快速	30min
升压	8000	线性	4h
聚焦	8000	快速	24000～40000V·h*
保持	500	快速	＜24h

注：*. 聚焦时间根据实验设计分别调整为24000、32000、40000V·h。

1.2.3 垂直电泳

将等电聚焦的胶条先后放在胶条平衡缓冲液Ⅰ和胶条平衡缓冲液Ⅱ中各平衡15min，根据实验设计，采用聚丙烯酰胺胶浓度分别为8%、10%、12%的均一胶进行第二向电泳，将融化的琼脂糖封胶液置于第二向胶上，约1cm高。取平衡好的IPG胶条，先在电泳缓冲液中进行快速冲洗，然后放在第二向胶上。在18℃的恒温条件下进行电泳，起始电流15mA，待蛋白从IPG胶条进入第二向胶后，恒流30mA条件下进行电泳3～4 h。每个实验条件做3次重复。

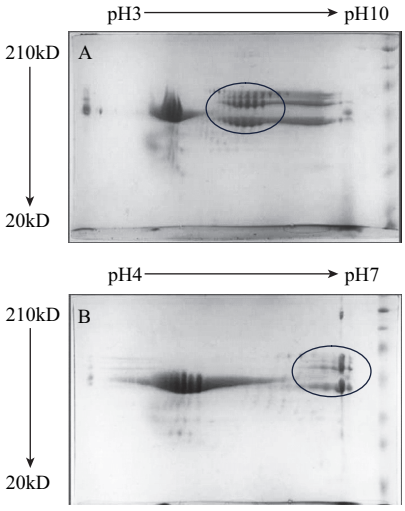
1.2.4 染色和图像扫描分析

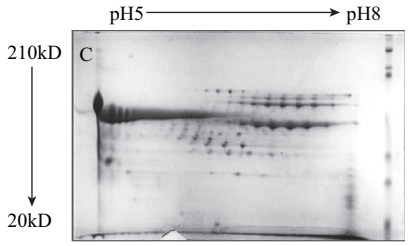
电泳结束后用固定液固定30min，CBB G-250染色1h，去离子水脱色直至背景为无色透明，蛋白质点清晰为止。脱色后凝胶使用凝胶成像仪透射模式进行扫描成像，所得图像使用 PDQuest V 7.3.0(Bio-Rad)进行分析。

2 结果与分析

2.1 IPG预制胶条的选择

在进行不同pH值范围的IPG胶条选择时主要考虑样品中蛋白质的主要分布情况。本实验采用pH 3～10、4～7、5～8的IPG胶条对蜂王浆蛋白样品分别进行双向电泳，结果如图1所示，当采用pH值范围为pH3～10的IPG胶条时，蛋白点较紧密地分布在凝胶的中间区域(如图1A圆圈中所示)，经PDQuest软件分析，共检测到42个蛋白点，由于蛋白点分布过于密集导致部分蛋白相互叠加覆盖，不利于后续的蛋白质点的切胶酶解及质谱鉴定。当采用pH 4～7的IPG胶条进行实验时，在凝胶中只检测到25个蛋白点，说明蜂王浆中有一部分蛋白并不分布在此pH值范围内，大量偏碱性蛋白丢失(如图1B圆圈中所示)。利用pH 5～8的IPG胶条获得的图谱其蛋白点数最多(66个)且蛋白分离效果明显，蛋白点清晰，因此，进行蜂王浆蛋白的双向电泳实验选择pH 5～8的IPG胶条，电泳效果最好。





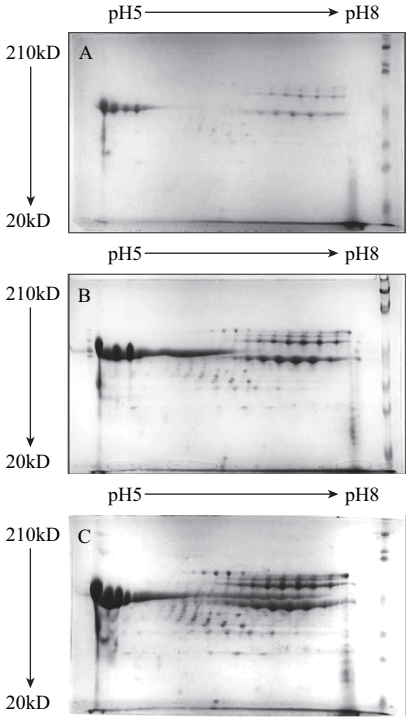
A. pH 3～10；B. pH 4～7；C. pH 5～8。

图 1 不同pH值范围的IPG胶条的双向电泳图谱比较

Fig.1 Comparison of 2-DE images with IPG strip at different pH ranges

2.2 蛋白质上样量的优化

选择合适的上样量对获得高质量的双向凝胶电泳图谱至关重要。蛋白上样量过低不利于低丰度蛋白的检出，上样量过高则会造成高丰度蛋白浓度过大从而连成一片，分辨率降低。蛋白质上样量的确定与IPG胶条的长度、pH值范围、聚焦时间的长短及蛋白质的染色方法密切相关。本实验选择11cm的pH5～8的IPG胶条，考马斯亮蓝G-250进行染色，上样量相对需要较大，如图2所示，当上样量为500μg时，通过PDQuest分析，只有16个蛋白点较清晰，其余较低丰度蛋白都模糊不清甚至丢失。当上样量为为250μg时，检测到71个蛋白点，蛋白点较多，但高丰度蛋白点过大，出现过饱和重叠现象，还有可能会掩盖周围低丰度蛋白点，且图谱上横条纹比较明显，会影响到后续蛋白质点的分离与分析。蛋白质上样量为150μg时，蛋白点清晰，可在凝胶上检测到66个点，聚焦效果好，分辨率高，图谱的质量最佳。



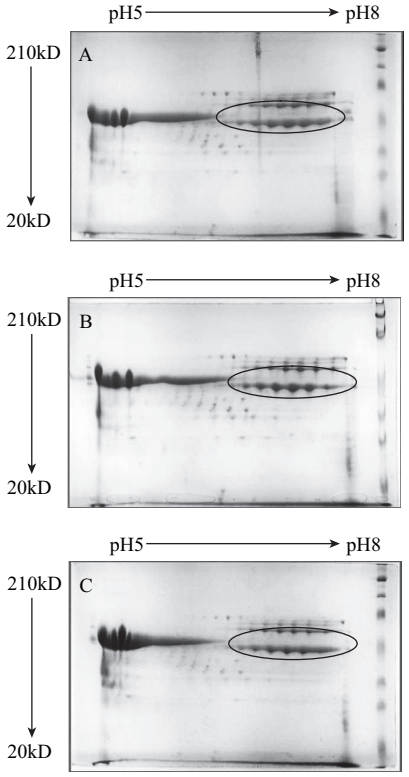
A. 蛋白质上样量50μg；B. 蛋白质上样量150μg；C. 蛋白质上样量250μg。

图 2 不同上样量的双向电泳图谱比较

Fig.2 Comparison of 2-DE images with different protein loading amounts

2.3 聚焦时间的优化

为了得到理想的2-DE图谱，本研究对等电聚焦电泳的聚焦时间进行了优化。聚焦时间同胶条的长度、pH值梯度、两性电解质以及蛋白上样量有关，聚焦时间不足容易造成高分子质量蛋白质聚焦不完全、蛋白点不圆等问题[19]。聚焦时间过长则有可能由于蛋白质在其等电点位置时不稳定而造成横向拖尾。本实验将聚焦时间分别设定为24000、32000、40000V·h，不同聚焦时间下得到的2-DE图谱有明显的区别。当聚集时间为24000V·h时，发现凝胶右侧偏碱性端蛋白点不圆(图3A圆圈中所示)，说明聚焦不充分；在32000V·h聚焦时在凝胶上显现的蛋白质点多且清晰，PDQuest软件分析检测到蛋白点数为66个；而当聚焦时间为40000V·h时，凝胶碱性端蛋白连成横线严重且分辨率相对较差(图3C圆圈中所示)，说明聚焦时间过长。以上表明，蜂王浆蛋白在聚焦达到32000V·h的情况下能充分地聚焦，得到较为理想的图谱。



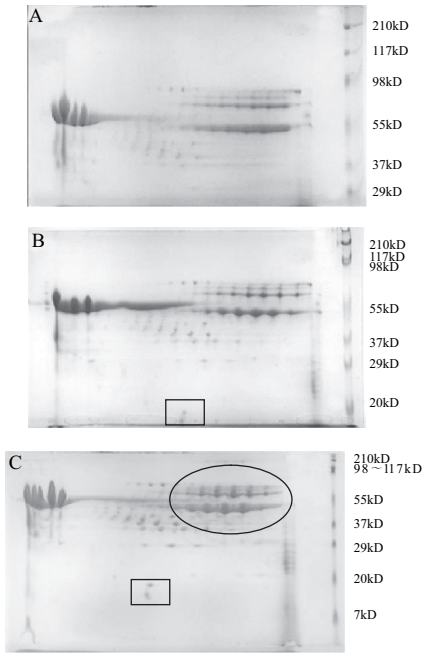
A. 24000V·h；B. 32000V·h；C. 40000V·h。

图3 不同聚焦时间的双向电泳图谱比较

Fig.3 Comparison of 2-DE images with different focusing time of IEF

2.4 垂直电泳丙烯酰胺胶浓度的优化

第二向分离胶的丙烯酰胺胶浓度会影响蛋白质的分离效果，本实验探讨了8%、10%和12%的分离胶对蜂王浆蛋白质的分离效果。由图4可知，大多数蛋白点虽然能在8%的分离胶中充分分开，但蛋白点的分离效果不理想，且分子质量30kD以下的蛋白点(如图4B和图4C中方框标记)丢失。在12%的分离胶中，分子质量大的蛋白质重叠严重(如图4C中圆圈所示)，不能完全分开，而且蛋白前沿离分离胶底端还有一段较长的距离，说明胶浓度太大。10%的分离胶不但可以充分分离分子质量大的蛋白，分子质量小的蛋白也不至丢失。根据以上结果认为，本实验中分离蜂王浆蛋白质的第二向分离胶最适丙烯酰胺胶浓度为10%。



A、B、C.丙烯酰胺胶分别为8%、10%、12%。

图4 不同丙烯酰胺胶浓度SDS-PAGE的双向电泳图谱的比较

Fig.4 Comparison of 2-DE images with different separating gel concentrations

3 讨 论

本研究所采用的蜂王浆为意大利蜜蜂(*Apis mellifera* L.)生产的油菜浆，意大利蜜蜂自上个世纪30年代引入中国后，经过半个世纪的发展成为中国生产蜂王浆的高产蜂种，年产蜂王浆2000t以上，大约占全世界蜂王浆总量的90%以上[19]。而早春油菜花期，由于气候适宜，蜜源丰富，蜂群处于繁殖期，适龄工蜂数量多，泌浆积极性高，生产的蜂王浆质量是全年中最佳的，产量也比较可观[21]。Furusawa等[11]曾研究过分别在两个不同开花时期采集的不同蜜源的蜂王浆的蛋白质组，并得出结论：蜂王浆中的蛋白组成是稳定的，不会因蜜源的不同产生较大差异。因而本研究的结果也适用于其他蜜源生产的蜂王浆。

前人的研究[9-13]大多以寻找蜂王浆中未知蛋白或对比不同蜂种产蜂王浆蛋白组差异为目的，因而需要利用可以展现更多蛋白点的大型胶。Li Jianke等[14]利用17cm

的双向电泳凝胶来研究蜂王浆蛋白质组，选择pH3～10的IPG胶条，上样量为200μg，聚焦时间为60000V·h，垂直胶浓度为12%，检测到的蛋白点数最多为62个。而Furusawa等[11]采用24cm的双向电泳凝胶来研究蜂王浆中蛋白，选取pH4～7的IPG胶条，上样量为100μg，聚焦时间为76908V·h，垂直胶采用梯度胶，胶浓度为12%～14%，可检测到105个蛋白点。本研究目的在于检测蜂王浆中已知蛋白的变化以推测蜂王浆的质量，从提高效率，简化实验，节省时间和成本等方面考虑，采用了11cm的中型双向电泳凝胶，因而在IPG胶条的选择、上样量、聚焦时间及垂直胶浓度上都与大型胶有所不同。综合各步骤不同条件下的实验结果，从蛋白点的分离效果、蛋白点的数量、分辨率等几个方面综合考虑，对于11cm的蜂王浆双向电泳的最适条件为采用pH5～8的IPG胶条，150μg的上样量，聚焦时间32000V·h，垂直胶丙烯酰胺浓度为10%，在此条件下，本实验对从蛋白提取到双向电泳的整个过程进行了3次重复，所得的双向电泳图谱具有较好的重复性，可检测到62±4个蛋白点，初步满足了双向电泳技术作为一种检测手段来检测蜂王浆蛋白质的条件，也为有效地监控蜂王浆质量并进一步规范蜂王浆市场提供了参考。

参考文献：

[1] KNECHT D, KAATZ H H. Patterns of larval food production by hypopharyngeal glands in adult worker honeybees[J]. Apidologie, 1990, 21: 457-468.

[2] BILIKOVA K, WU G S, SIMUTH J. Isolation of a peptide fraction from honeybee royal jelly as a potential antifoulbrood factor[J]. Apidologie, 2001, 32(3): 275-283.

[3] LI Jianke, CHEN Shenglu. Royal jelly and human health[J]. Am Bee J, 2003, 143(5): 398-402.

[4] TOKUNAGA K H, YOSHIDA C, SUZUKI K M, et al. Antihypertensive efect of peptides from royal jelly in spontaneously hypertensive rats[J]. Biol Pharm Bull, 2004, 27(2): 189-192.

[5] OKA H, EMORI Y, KOBAYASHI N, et al. Suppression of allergic reactions by royal jelly in association with the restoration of macrophage function and the improvement of Th1/Th2 cell responses[J]. Int Immunopharmacol, 2001, 1(3): 521-532.

[6] FUJII M, YONEKURA M, HIGUCHI T, et al. Effect of 350 kDa glycoprotein in royal jelly onprimary culture of rat hepatocytes[J]. Food Sci Technol Int, 1996, 2: 223-225.

[7] OKAMOTO I, TANIGUCH Y, KUNIKATE T, et al. Major royal jelly protein 3 modulates immune responses *in vitro* and *in vivo*[J]. Life Sci, 2003, 73: 2029-2045.

[8] DRAPEAU M D, ALBERT S, KUEHARSKI R, et al. Evolution of the yellow/major royal jelly protein family and the emergence of social behavior in honey bees[J]. Genome Res, 2006, 16: 1385-1394.

[9] SANO O, KUNIKATE T, KOHNO K, et al. Characterization of royal jelly proteins in both Africanized and European honeybees (*Apis mellifera*) by two-dimensional gel electrophoresis[J]. J Agric Food Chem, 2004, 52: 15-20.

[10] SCHONLEBEN S, SICKMANN A, MUELLER M J, et al. Proteome analysis of *Apis mellifera* royal jelly[J]. Anal Bioanal Chem, 2007, 389(4): 1087-1093.

[11] FURUSAWA T, RAKWAL R, NAM H W, et al. Comprehensive royal jelly (RJ) proteomics using one- and two-dimensional proteomics platforms reveals novel RJ proteins and potential phospho/glycoproteins[J]. J Proteome Res, 2008, 7(8): 3194-3229.

[12] QU Ning, JIANG Jie, SUN Liangxian, et al. Proteomic characterization of royal jelly proteins in Chinese (*Apis cerana cerana*) and European (*Apis mellifera*) honeybees[J]. Biochemistry(Mosc), 2008, 73: 676-680.

[13] FANG Yu, FENG Mao, LI Jianke. Royal jelly proteome comparison between *A. mellifera ligustica* and *A. cerana cerana*[J]. J Proteome Res, 2010, 9(5): 2207-2215.

[14] LI Jianke, FENG Mao, ZHANG Lan, et al. Proteomics analysis of major royal jelly protein changes under different storage conditions[J]. J Proteome Res, 2008, 7(8): 3339-3353.

[15] HOLT D L, ZEECE M G. Two-dimensional electrophoresis of bovine milk proteins[J]. Journal of Dairy Science, 1988, 71: 2044-2050.

[16] KIM S, KWEON S M, KIM E A. Characterization of Rnase-like major storage protein from the ginseng root by proteomic approach[J]. Journal of Plant Physiology, 2004, 161(7): 837-845.

[17] INGER V H, KJAERSGARD I V, JESSEN F J, et al. Proteome analysis elucidating post-mortem changes in cod(*Gadus morhua*) muscle proteins[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(14): 3985-3991.

[18] MARTINEZ I, SLIZYTE R, DAUKSAS E, et al. High resolution two-dimensional electrophoresis as a tool to differentiate wild from farmed cod(*Gadus morhua*) and to assess the protein composition of klipfish[J]. Food Chemistry, 2007, 102(2): 504-510.

[19] LI Jianke, WANG Ting, ZHANG Zhaohui, et al. Proteomic analysis of royal jelly from three strains of western honeybees (*Apis mellifera*)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55: 8411-8422.

[20] 魏开华, 应天翼. 蛋白质组学实验技术精编[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 29-31.

[21] 胡福良, 李英华, 朱威. 影响蜂王浆质量的因素: 兼析春季油菜王浆质优的原因[J]. 蜜蜂杂志, 2004(6): 28-29.