

蜂王浆中主蛋白成分(MRJP2)的分离纯化及圆二色谱分析

胡熠凡^{1,2}, 陈忠周², 田文礼^{1,2}, 赵亚周¹, 彭文君^{1,*}

(1.中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100093; 2.中国农业大学生物学院, 农业生物技术国家重点实验室, 北京 100193)

摘要: 利用亲和层析、分子筛层析和离子交换层析从新鲜蜂王浆中提取蜂王浆中主蛋白成分(MRJP2)的单一组分, 经SDS电泳和质谱鉴定为MRJP2后, 再通过圆二色谱技术对MRJP2在不同温度、不同pH值、不同离子浓度下二级结构的变化情况进行检测。结果表明: 10~90℃升温过程中, α 螺旋比例增加、 β 折叠和无规则卷曲比例减少, β 转角比例变化不大; pH值由4.0上升到9.0过程中, α 螺旋比例先减少后增加, β 折叠比例在pH5.0时最高, β 转角比例基本不变, 无规则卷曲比例在pH8.0时最高; 蛋白溶液中添加不同金属离子后, Ca^{2+} 可以促进 α 螺旋比例增加, 而 Mg^{2+} 和 Zn^{2+} 会明显降低 α 螺旋比例。

关键词: 蜂王浆; MRJP2; 纯化; 二级结构; 圆二色谱

Circular Dichroism Analysis of MRJP2 Purified from Royal Jelly

HU Yi-fan^{1,2}, CHEN Zhong-zhou², TIAN Wen-li^{1,2}, ZHAO Ya-zhou¹, PENG Wen-jun^{1,*}

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

2. State Key Laboratory of Agro-biotechnology, College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: MRJP2, a member of the major royal jelly protein (MRJP) family, was extracted from fresh royal jelly, purified by affinity chromatography, molecular sieve chromatography and ion exchange chromatography and identified by SDS-PAGE and mass spectrum. The MRJP protein was analyzed by synchrotron radiation circular dichroism (SRCD) to clarify its secondary structure as a function of temperature, pH and ion concentrations. The results of this study showed that heat treatment at elevated temperatures from 10 to 90 °C resulted in increased proportion of α -helix and decreased proportion of β -strand and random coil, while the proportion of β -turn kept stable. As the pH varied from 4.0 to 9.0, the proportion of α -helix revealed an initial decrease followed by an increase, the highest proportions of β -strand and random coil were found at pH 5.0 and 8.0, respectively, and the proportion of β -turn remained basically unchanged. After different metal ions were added in the protein solution, the proportion of α -helix was increased by Ca^{2+} but decreased by Mg^{2+} and Zn^{2+} .

Key words: royal jelly; MRJP2; purification; secondary structure; circular dichroism (CD)

中图分类号: TS201.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)23-0057-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201323013

蜂王浆是由蜂群中青年工蜂头部的咽下腺和上颚腺分泌而来, 呈现为一种黏稠的乳浆状物质, 主要用于饲喂蜂王及3日龄内的幼虫^[1-3]。蜂王浆富含多种对机体有益的物质, 其中蛋白质约占干质量的50%, 包括水溶性蛋白质和水不溶性蛋白质。水溶性蛋白质占蜂王浆中总蛋白质含量的46%~89%, 为蜂王浆蛋白质的主要部分, 称为蜂王浆主蛋白(major royal jelly proteins, MRJPs)^[4-5]。蜂王浆主蛋白成分为一个蛋白质家族, 迄今为止, 研究人员已经发现10个成员(MRJP1~MRJP9和MRJP ψ)^[6-7]。

MRJPs具有多种生物学功能, 如参与决定蜂群中雌性蜂的级型分化^[8-9], 为幼虫的发育提供必要的可利用氮元素^[10-11], 以及可能在蜜蜂行为调控中起作用等^[12-14]。但是MRJPs中各个成员之间的功能不同, 所以针对MRJPs中单一组分的研究很有必要。MRJP2是该蛋白质家族的第2个成员, 分子质量为49~51ku, 等电点为6.2~7.9, 属于一种弱碱性糖蛋白, 其在蜂王浆主蛋白中含量为16%左右^[3,14]。Simúth等^[15]研究发现MRJP2可以刺激小鼠巨噬细胞释放肿瘤坏死因子(TNF- α), 提出其抗癌应用的潜在生理价值。Bíliková

收稿日期: 2012-11-26

基金项目: 国家现代农业(蜜蜂)产业技术体系建设专项(NYCYTI-43-KXJ17); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2012ZL077)

作者简介: 胡熠凡(1987—), 男, 硕士研究生, 主要从事功能食品与生物活性物质研究。E-mail: usda52@gmail.com

*通信作者: 彭文君(1970—), 男, 研究员, 硕士, 主要从事功能食品与生物活性物质研究。E-mail: pengwenjun@vip.sina.com

等^[16]研究发现MRJP2能够抑制芽孢杆菌属(*Paenibacillus larvea*)的生长,提示蜂王浆中功能蛋白组分MRJP2在药物研究方面的应用前景。近年来,关于MRJPs的分离纯化方法主要依赖于离子交换层析和分子筛层析。较早的有Chen等^[17]采用Sepacryl S-200分子筛层析分离得到MRJP1和MRJP2两种蛋白的混合物,未能进一步分离。Simúth^[1]采用超速离心(245000×g, 5h, 6℃)的方法分离得到纯度较高的MRJP1蛋白。Schimitzova等^[5]经多次反复上样DEAE-52离子交换柱,分离纯化出MRJP1和MRJP2两种蛋白。Bíliková等^[18]利用DEAE Sephadex离子交换柱分离出了蜂王浆中的一种小肽Apisimin。Sano等^[19]采用DEAE-5PW离子交换层析和Superdex-200分子筛层析结合的方法,分离得到了MRJP3。近两年如Gabriel等^[20]只采用Mono-Q柱也分离得到了MRJP1和MRJP2两种蛋白。以上这些分离方法大多采用单一柱层析进行反复分离,而反复上样容易导致蛋白损失过多,并且其采用的柱材在分离精度和范围上有一定的局限性。再者,蜂王浆蛋白家族中有些蛋白含量较低、等电点集中,分子质量接近,采用一种柱层析方法难以将其分离纯化。所以,本实验尝试根据蜂王浆蛋白的性质,采用3种精度较高的的柱材对其进行联合分离,和以往的分析方法相比,具有蛋白量损失小和分辨率高等优点。

同步辐射真空紫外圆二色光谱(synchrotron radiation circular dichroism, SRCD)是测定蛋白质二级结构的光谱技术,可用于研究不同实验条件对蛋白质二级结构变化的影响^[21-22]。在圆二色谱法测量中,蛋白质和多肽有许多官能团在可见光区或紫外光区有圆二色信号吸收带,蛋白质的各二级结构都有其特征圆二色光谱和波长^[23-25]。Bíliková等^[18]利用圆二色谱技术测定蜂王浆蛋白中小肽段(apisimin),发现其二级结构与前人预测结果一致。Gabriel等^[20]利用圆二色谱研究了Ca²⁺浓度、pH值和温度对MRJP1结构稳定性的影响,结果发现Ca²⁺可以增加MRJP1对温度和pH值敏感性。目前为止,尚未发现关于MRJPs家族中其他成员二级结构的研究报道,蜂王浆中蛋白质结构信息的缺乏必将影响其生物学功能的研究进程。鉴于此,本实验拟对蜂王浆中纯化的MRJP2二级结构进行SRCD研究,并分析不同实验条件对MRJP2二级结构的影响,以期对蜂王浆中功能蛋白组分生物学功能的研究提供一定的理论参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

纯鲜意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*)蜂王浆样品采自中国农业科学院蜜蜂研究所实验蜂场,采收后置于-80℃保存备用。

Tris、咪唑 美国Sigma-Aldrich公司;醋酸钙、硫酸镁、硫酸锌 北京化工厂;蛋白分子质量Marker 北京天根生化公司;MALDI-TOF质谱标准蛋白混合物(包括angiotensin i、angiotensin ii、substance p、bombesin、acth clip(1-17)、acth clip(18-39)和somatostatin(28)7种标准蛋白) 德国Bruker公司;所有试剂均为分析纯;水为超纯水。

1.2 仪器与设备

同步辐射真空紫外圆二色谱装置 中国科学院高能物理研究所;BioRad Duoflow蛋白纯化仪 美国BioRad公司;Ni Sepharose™ 6 Fast Flow (100mL)、Q Sepharose™ High Performance (75mL)、Superdex™ 200 10/30GL 美国GE Healthcare公司;CR22GIII离心机 德国Sigma公司;DYY-4C型电泳仪 北京六一仪器厂;754型紫外分光光度计 上海光谱仪器公司;Amicon Ultra超滤管(30ku) 美国Millipore公司;Autoflex III型基质辅助激光解析电离飞行时间质谱仪(MALDI-TOF-MS) 德国Bruker公司。

1.3 方法

1.3.1 蜂王浆蛋白的分离纯化

新鲜蜂王浆1g溶于10mL缓冲液(40mmol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄, pH7.3),混匀后,于4℃、14000×g离心30min。取上清液过0.45μm微孔滤膜,滤液即为蜂王浆粗提液。取10mL蜂王浆粗提液上样镍柱,收集穿透液,为目的蛋白(I)并浓缩至1mL,利用SDS-PAGE电泳检测其分子质量和纯度。目的蛋白(I)过0.22μm微孔滤膜,进行Superdex 200分子筛纯化,条件为:缓冲液(20mmol/L Tris-HCl, 150mmol/L NaCl, pH8.0),流速0.3mL/min。根据280nm波长处的紫外吸收峰收集目的蛋白(II)溶液,使用超滤管降低缓冲液盐浓度,浓缩至5mL备用。分子筛纯化后的样品经Q Sepharose柱进行离子交换,并经线性盐溶液洗脱,洗脱条件为:缓冲液(20mmol/L Tris-HCl, 0~1000mmol/L NaCl, pH8.0),流速1mL/min。根据280nm波长处的紫外吸收峰收集溶液,为目的蛋白(III),浓缩至10mg/mL。最后,利用SDS-PAGE电泳检验目的蛋白(III)的纯度。

1.3.2 质谱鉴定

目的蛋白(III)用胰蛋白酶酶切过夜后,取1μL样品和1μL α-氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA)基质溶液(5g/L)混合后风干,进行质谱上样。质谱仪分析采用正离子线性模式检测,离子解析电离源为脉冲氮激光(337nm),离子加速电压为20kV,平均每次测定样品的激光脉冲次数为100次/秒,质谱信号为多次累加扫描。采用标准蛋白混合物作外标标定多肽质谱峰位,得到多肽片段,最终通过Swiss Prot数据库(<http://www.uniprot.org>)对目的蛋白进行检索鉴定。

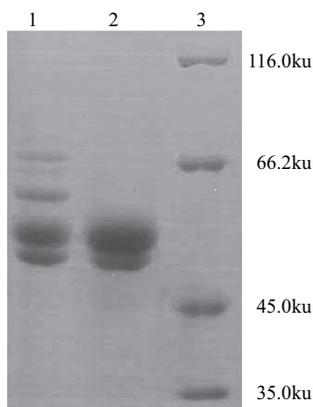
1.3.3 圆二色谱分析

纯化后目的蛋白(III)溶液置于超滤管中, 利用反复浓缩的方法替换为缓冲液PBS(10mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$), pH值分别调整为4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0, 设置不同pH值实验组; 另取目的蛋白溶液(缓冲液为: 10mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$, pH8.0)分别添加不同浓度的 Ca^{2+} (1、5、10mmol/L)、 Mg^{2+} (10mmol/L)、 Zn^{2+} (10mmol/L)。根据仪器响应水平将蛋白质量浓度浓缩为6mg/mL, 并设置对照组(CK), 其缓冲液为10mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$, pH8.0。

圆二色谱条件: 储存环的电子能量为1.5GeV, 束流强度为450mA。波长扫描范围为175~260nm, 步长1.0nm, CaF_2 样品池厚度0.005mm, 停留时间1min, 扫描次数7次, 测量温度为20℃。变温实验中扫描温度为10~90℃, 每10℃为一个梯度。CD谱利用CD Tool软件进行数据处理, 所得数据进行在线二级结构分析(<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk>), 选择CDSSTR算法计算二级结构的 α 螺旋、 β 折叠、 β 转角和无规卷曲的含量。

2 结果与分析

2.1 MRJP2的分离纯化



1.蜂王浆粗提液; 2.目的蛋白(I); 3.标准蛋白Marker。

图1 SDS-PAGE检测亲和层析后的目的蛋白(I)

Fig.1 SDS-PAGE analysis of target protein (I)

新鲜蜂王浆经镍柱亲和层析后, 蜂王浆粗提液和目的蛋白(I)经SDS-PAGE电泳检测结果见图1。目的蛋白(I)正上方分子质量较大的蛋白杂带已去除干净, 仅剩分子质量为50ku左右的两条明显条带。分子筛层析图谱结果见图2, 由Superdex 200分子筛的标准蛋白Marker图谱可知, 洗脱体积在14mL的蛋白峰对应的分子质量在158ku左右, 其可能为目的蛋白(I)的多聚体。洗脱体积在18mL左右的峰对应的蛋白分子质量在50ku左右, 与MRJP2的分子质量相当, 收集其为目的蛋白(II)上样离子交换层析。由最终的离子交换图谱(图3)可见, 本实验

中的样品上样前采用了充分的脱盐处理, 使得洗脱液体积在0~40mL时未出现紫外吸收峰, 说明样品与离子交换柱结合完全, 增加后期洗脱过程中目的蛋白的纯化得率; 洗脱液体积在40~90mL之间时, 出现2个明显峰, 说明蜂王浆中其他蛋白质可能已被去除, 可能仅剩余含量最高的MRJP1和MRJP2蛋白; 图谱中2个峰峰型尖锐对称, 表明纯化蛋白均一性良好; 另据前人报道^[3,22], MRJP2与离子交换柱的结合能力弱于MRJP1而先被洗脱下来, 故推测第1个紫外吸收峰为MRJP2, 收集其为目的蛋白(III)。

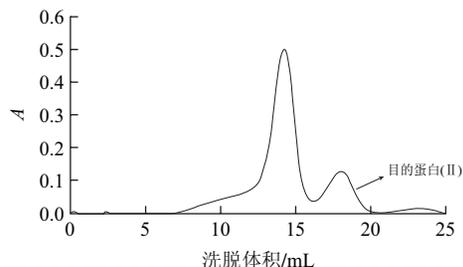


图2 目的蛋白(I)的分子筛图谱

Fig.2 Size exclusive chromatogram of target protein (I)

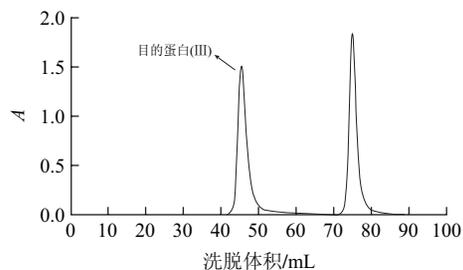
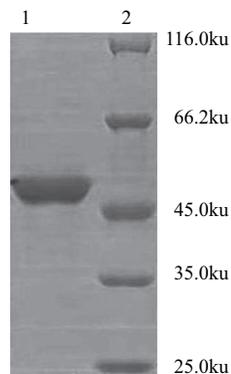


图3 目的蛋白(II)的离子交换图谱

Fig.3 Ionexchange chromatogram of target protein (II)

2.2 MRJP2的定性分析结果



1.目的蛋白(III); 2.标准蛋白Marker。

图4 SDS-PAGE检测纯化的目的蛋白(III)

Fig.4 SDS-PAGE analysis of purified target protein (III)

根据图3信息对离子交换过程中42~50mL的蛋白洗脱溶液收集后进行浓缩, 再利用SDS-PAGE电泳对其进

行检测, 结果见图4。蛋白条带明显且单一, 无其他杂蛋白, 说明目的蛋白纯化效果较好。目的片段大小约为50ku, 与之前关于MRJP2分子质量的报道一致^[3,22], 初步确认目的蛋白(III)为MRJP2。

MTRWLFMVAC LGIACQGAIV RENSPRNLEK SLNVIHEWKY FDYDFGSEER
 RQAAIQSGEY DHTKNYPFDV DQWRDKTFVT ILRYDGVFST LNVIISGKTGK
 GGRLLKPYPD WSFAEFKDCS KIVSAFKIAI DKFDRLWVLD SGLVNRVTPV
 CAPKLVHFDL KTSNHLKQIE IPHDIIVNAT TGKGGVLSLA VQAIIDLANTL
 VYMAADHKGDA LIVYQNADDS FHRLTSNTFD YDPRYAKMTI DGESFTLKNG
 ICGMALSFPVT NNLYYSPLAS HGLYYVNTAP FMKSQFGENN VQYQGSSEDIL
 NTQSLAKAVS KNGVLVFGVLV GNSAVGCWNE HQSLQRQNL E MVAQNDRTLQ
 MIAGMKIKEE LPHFVGSNKP VKDEYMLVLS NRMQKIVNDD FNFDVNFRI
 LGANVKELIR NTHCVNNQN DNIQNTNNQN DNNQKNNKN ANNQKNNQN
 DN

图5 质谱肽段碎片匹配结果(匹配片段用下划线标出)

Fig.5 Polypeptide matching of MRJP2 (matched fragment highlighted with underline)

将目的蛋白(III)用胰蛋白酶酶切过夜后, 进行质谱上样, 结果得到分子质量较大的多个多肽片段, 通过Swissprot数据库(<http://www.uniprot.org>)检索, 与已知蛋白序列进行匹配, 多肽片段匹配情况如图5所示, 序列覆盖率为49.34%。匹配序列与MRJP2的匹配得分最高, 且为唯一及格蛋白, 故经生物信息学比对结果进一步确认该蛋白为蜂王浆主蛋白成分MRJP2。

2.3 温度对MRJP2二级结构的影响

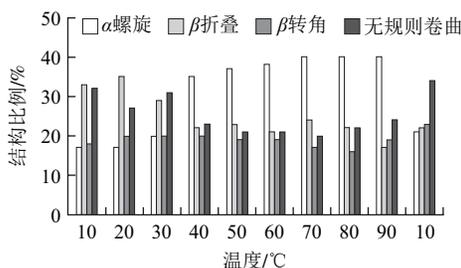


图6 MRJP2二级结构随温度变化情况

Fig.6 Changes in secondary structures of MRJP2 with temperature

圆二色谱的梯度温度设置为10~90°C, 最终降温至10°C, 对MRJP2蛋白溶液进行测试后, 其图谱经CD Tool和CD SSTR算法处理, 得到各个温度下二级结构组成及变化情况。由图6可知, α螺旋比例大致随温度的升高而升高; β折叠和无规则卷曲比例大致随温度升高而降低, β转角比例的变化随温度变化不明显。当温度重新下降至10°C时, 与起始温度10°C条件下的二级结构比例相比, α螺旋和β转角比例略有增加, β折叠比例降低, 无规卷曲未发生明显变化, 说明MRJP2经高温处理发生较小程度的不可逆变性。

2.4 pH值对MRJP2二级结构的影响

将MRJP2溶液的pH值按照实验条件进行设置后, 经SRCD测试, 图谱经CD Tool和CD SSTR算法处理, 得到各pH值下二级结构组成及变化情况。由图7可知, 当pH

值从4.0变化到9.0的过程中, α螺旋比例呈“两头高, 中间低”的态势, 表明在强酸或强碱情况下MRJP2中的α螺旋比例较高; β折叠比例变化不大, 其中在pH5.0、6.0、7.0时最高; β转角比例基本处于不变状态; 无规则卷曲比例在pH8.0时最高, 其余pH值情况下基本一致。

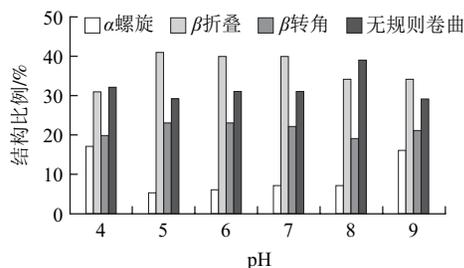


图7 MRJP2二级结构随pH值变化情况

Fig.7 Changes in secondary structures of MRJP2 with pH

2.5 不同金属离子对MRJP2二级结构的影响

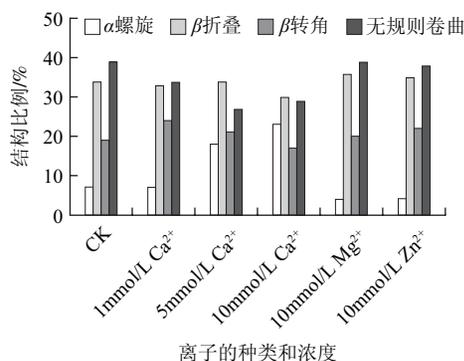


图8 MRJP2二级结构随离子种类及浓度变化的变化情况

Fig.8 Changes of secondary structures of MRJP2 with metal ion type and concentration

向MRJP2溶液中添加不同种类和浓度的金属离子后, 经SRCD测试, 图谱经CD Tool和CD SSTR算法处理, 得到不同种类和浓度金属离子下的二级结构组成及变化情况。由图8可知, 与CK组相比, α螺旋比例随Ca²⁺浓度的升高而升高, 呈现明显的剂量-效应关系, 而Mg²⁺和Zn²⁺会明显降低α螺旋比例; β折叠和β转角比例受离子种类和浓度影响不明显; 高浓度Ca²⁺可以一定程度降低无规卷曲比例, Mg²⁺和Zn²⁺则对其影响不大。

3 结论

本研究根据蜂王浆蛋白质的特性, 首次采用亲和层析、分子筛层析、离子交换层析3种方法联合分离MRJP2蛋白, 和以往的分析方法相比, 具有蛋白质量损失小和分辨率高等优点。所有分离纯化操作程序均在4°C条件下进行, 避免蛋白变性降解, 从而最终保证了目的蛋白的含量。随后将圆二色谱分析过程中的蛋白缓冲溶液替换

为对紫外光吸收不强烈的PBS,降低实验误差。通过以上实验方法的提高与改进,使得目的蛋白的纯度及得率较高,适宜进一步的SRCD分析。研究中采用SDS-PAGE电泳和质谱2种方法对目的蛋白进行定性,保证了蜂王浆中纯化的MRJP2的真实性。

通过设置不同实验条件,对MRJP2进行圆二色谱分析,发现MRJP2二级结构含量变化受温度、pH值和Ca²⁺影响较大,而10mmol/L的Mg²⁺、Zn²⁺对MRJP2的二级结构影响不大。根据刘权等^[26]报道, β 折叠是蛋白质热稳定的基础,如果升温过程中 β 折叠比例变化不大,则其热稳定性良好,说明本研究中MRJP2的耐热性较差,并会发生不可逆的热变性现象。本研究结果显示,MRJP2在pH5.0、6.0、7.0时,其二级结构比例未发生明显的变化,该种现象的原因可能是天然状态下,蜂王浆偏酸性易于保持其中蛋白质结构和功能的稳定性,而当pH4.0时,其二级结构比例发生较大改变,提示蜂王浆在强酸条件下可能变性。关于金属离子对MRJP2二级结构影响实验中, α 螺旋比例随Ca²⁺浓度增加而增加,存在剂量-效应关系,而Mg²⁺和Zn²⁺则显著降低 α 螺旋比例,其他二级结构比例变化不大。根据Gabriel等^[20]报道, Ca²⁺可降低MRJP1对温度的敏感性,是由于Ca²⁺使 β 折叠在外界环境温度变化的情况下保持了稳定状态。而本研究中, Ca²⁺亦能影响MRJP2二级结构比例,分析原因可能是由于MRJP2与MRJP1属于同一蛋白家族,结构性质相似。

综上所述,不同实验条件如温度、pH值、金属离子种类和浓度等均可以导致MRJP2二级结构比例发生一定程度的变化,或者导致各二级结构之间发生相互转化,而蛋白质结构的变化往往伴随其功能的改变,因此,本研究结果有助于为不同生产及储存条件下蜂王浆生物学功能变化情况的研究提供一定的理论参考。

参考文献:

- [1] SIMÚTH J. Some properties of the main protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly[J]. Apidologie, 2001, 32(1): 69-80.
- [2] SRISUPARBH D, KLINBUNGA S, WONGSIRI S, et al. Isolation and characterization of major royal jelly cDNAs and proteins of the honey bee (*Apis cerana*)[J]. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2003, 36(6): 572-579.
- [3] HOWE S, DIMICK P, BENTON A. Composition of freshly harvested and commercial royal jelly[J]. Journal of Apicultural Research, 1985, 24(1): 52-61.
- [4] ALBERT S, KLAUDINY J, SIMÚTH J. Molecular characterization of MRJP3, highly polymorphic protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 1999, 29: 427-434.
- [5] SCHMITZOVA J, KLAUDINY J, ALBERT S, et al. A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L.[J]. Cellular Molecular Life Science, 1998, 54(9): 1020-1030.
- [6] KIMURA Y, NAGAI H, MIYAMOTO M, et al. Identification of a royal jelly glycoprotein that carries unique complex-type N-glycans harboring the T-antigen (Galbeta1-3GalNAc) unit[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2010, 74(10): 2148-2150.
- [7] KIMURA Y, USHIJIMA T, MAEDA M, et al. Tumor antigen occurs in N-glycan of royal jelly glycoproteins: honeybee cells synthesize T-antigen unit in N-glycan moiety[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2006, 70(10): 2583-2587.
- [8] KAMAKURA M. Royalactin induces queen differentiation in honeybees[J]. Nature, 2011, 473: 478-483.
- [9] DRAPEAU M, ALBERT S, KUCHARSKI R, et al. Evolution of the Yellow/Major Royal Jelly Protein family and the emergence of social behavior in honey bees[J]. Genome Research, 2006, 16(11): 1385-1394.
- [10] ALBERTOVA V, SU S, BROCKMANN A, et al. Organization and potential function of the mrjp3 locus in four honeybee species[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(20): 8075-8081.
- [11] DRAPEAU M D, ALBERT S, KUCHARSKI R, et al. Evolution of the Yellow/Major Royal Jelly Protein family and the emergence of social behavior in honey bees[J]. Genome Research, 2006, 16(1): 385-394.
- [12] ALBERTOV V, SU S, BROCKMANN A, et al. Organization and potential function of the mrjp3 locus in four honeybee species[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(20): 8075-8081.
- [13] ROBINSON G E, GROZINGER C M, WHITFIELD C W. Sociogenomics: social life in molecular terms[J]. Nature Reviews Genetics, 2005, 6: 257-260.
- [14] TAMURA S, AMANO S, KONO T, et al. Molecular characteristics and physiological functions of major royal jelly 1 oligomer[J]. Proteomics, 2009, 9(5): 534-543.
- [15] SIMÚTH J, BILIKOVA K, KOVACOVA E. Immunochemical approach to detection of adulteration in honey: physiologically active royal jelly protein stimulating TNF-alpha release is a regular component of honey[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(2): 154-158.
- [16] BÍLIKOVÁ K, EKATERINA M, et al. Towards functional proteomics of minority component of honeybee royal jelly: the effect of post-translational modifications on the antimicrobial activity of apalbumin2[J]. Proteomics, 2009, 9: 2131-2138.
- [17] CHEN C S, CHEN S Y. Changes in protein components and storage stability of Royal Jelly under various conditions[J]. Food Chemistry, 1995, 54: 195-200.
- [18] BÍLIKOVÁ K, HANES J, NORDHOFF E, et al. Apisimin, a new serine-valine-rich peptide from honeybee (*Apis mellifera* L.) royal jelly: purification and molecular characterization[J]. FEBS Letters, 2002, 528(1/3): 125-129.
- [19] 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]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(1): 15-20.
- [20] GABRIEL C N, LIUDY G, ADELSON J S. Calcium effect and pH-dependence on self-association and structural stability of the *Apis mellifera* major royal jelly protein 1[J]. Apidologie, 2011, (42): 252-269.
- [21] LEES J, MILES A, WIEN F, et al. A reference database for circular dichroism spectroscopy covering fold and secondary structure space[J]. Bioinformatics, 2006, 22(16): 1955-1962.
- [22] OAKLEY M, HIRST J. Charge-transfer transitions in protein circular dichroism calculations[J]. Journal of the American Chemical Society, 2006, 128(38): 12414-12415.
- [23] KELLY M S, PRICE N C. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function[J]. Current Protein and Peptide Science, 2000, 1(4): 349-384.
- [24] WALLACE B, JANES R. Synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy of proteins: secondary structure, fold recognition and structural genomics[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2001, 5(5): 567-571.
- [25] WHITMORE L, WALLACE B. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases[J]. Biopolymers, 2008, 89(5): 392-400.
- [26] 刘权, 李唐, 曾洪梅, 等. 通过圆二色谱研究蛋白激酶子PeaT1的耐热性[J]. 农业生物技术学报, 2010, 18(3): 592-596.