中华蜜蜂和蜜蜂蜂王浆N-糖基化修饰比较研究

冯　毛

2015.09

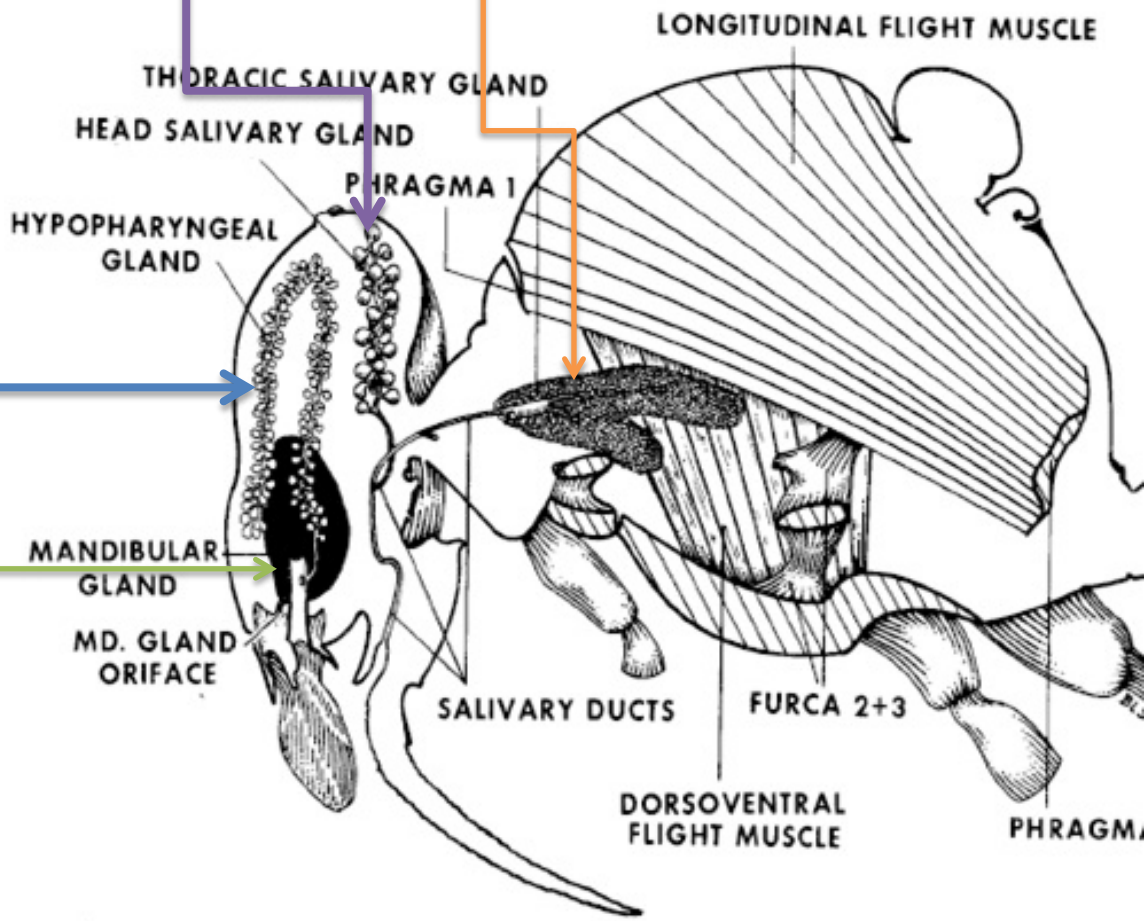
蜂王浆

胸部唾液腺

头部唾液腺

咽下腺

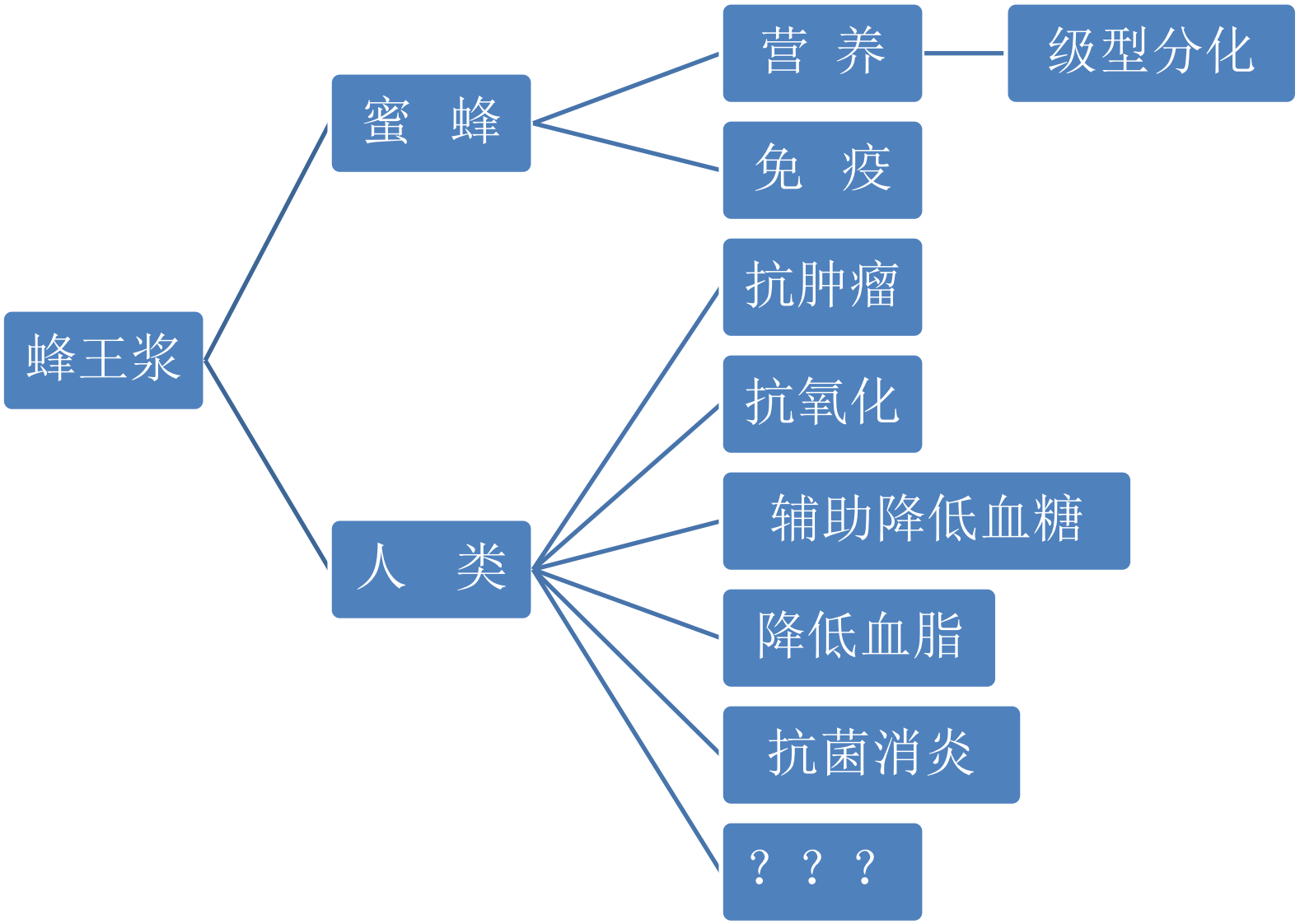
上颚腺



蜂王浆的主要成分

水分	蛋白	碳水化合物	脂类	矿物质	未知成分
60~70%	10~15%	13~15%	~6%	0.5~2%	~3%
	约占蜂王浆干重的**50%**，**王浆主蛋白家族**	葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖	10－羟基－2－癸烯酸（王浆酸）	铁、铜、镁、锌、钾、钠	

蜂王浆的功效



意大利蜜蜂和中华蜜蜂

意大利蜜蜂（意蜂）



-西方蜜蜂

-饲养规模最大(> 800群)

-蜂王浆产量高，浆蜂(>10 kg /群·年）

-*易受蜂螨侵害*

中华蜜蜂（中蜂）

-本土蜂种

-王浆产量低

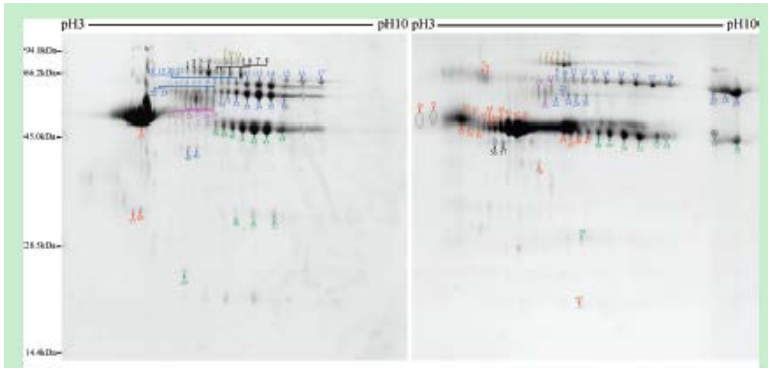
-抗螨性

-耐低温及极端环境、善于采集零星蜜粉源

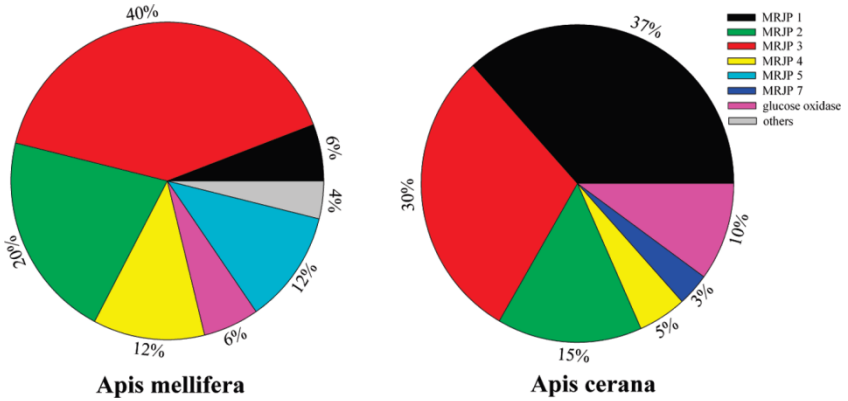
-饲养规模>200万群，主要用于生产蜂蜜



中意蜂蜂王浆蛋白质组比较



意蜂　　中蜂



-蛋白质翻译后修饰；

-在蛋白类别上无明显差异；

-但意蜂浆的蛋白丰度显著高于中蜂(Fang et al. 2010)

中意蜂蜂王浆在功能上存在差异

1、 用中蜂蜂王浆饲喂意蜂幼虫

-意蜂幼虫会呈现出中蜂幼虫的形态特征(Zhang et al. 2014)；

-影响意蜂幼虫的转录后修饰(Shi et al. 2014)；

-提高意蜂对蜂螨的抗性。

2、用意蜂蜂王浆饲喂中蜂幼虫

-提高中蜂对中囊病的抵抗力(Zhang et al. 2014).

功能上的差异是如何产生的？

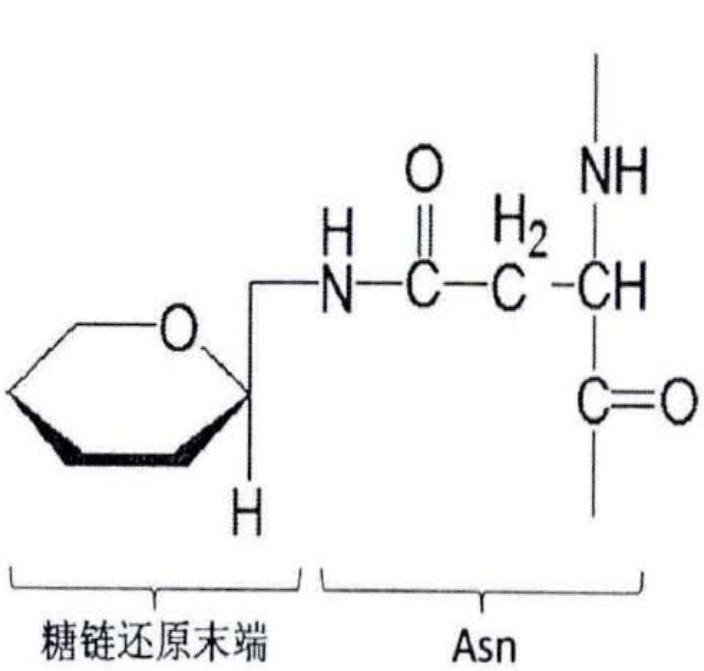
蛋白质的翻译后修饰

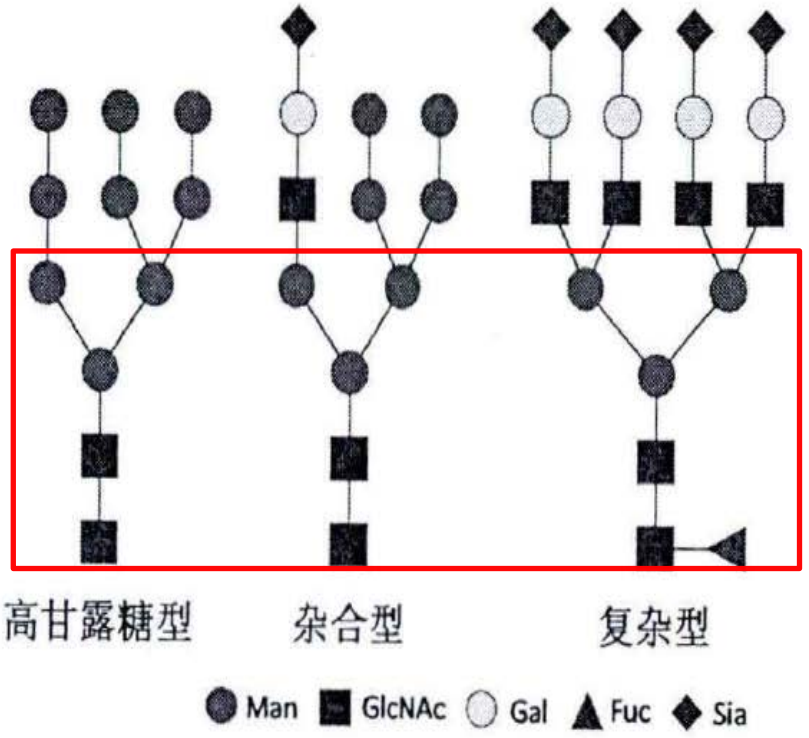
1、蜂王浆是糖蛋白。

2、蛋白质**糖基化修饰**参与众多生物进程的调节：细胞增殖、分化、生长、死亡、信号转导等(Ruddet al. 2001), 也与蛋白质的折叠、稳定性、溶解性和转运等相关(Lis and Sharon 1993).

N-linked 糖基化修饰

蛋白特征序列：N-X-S/T (X≠P)





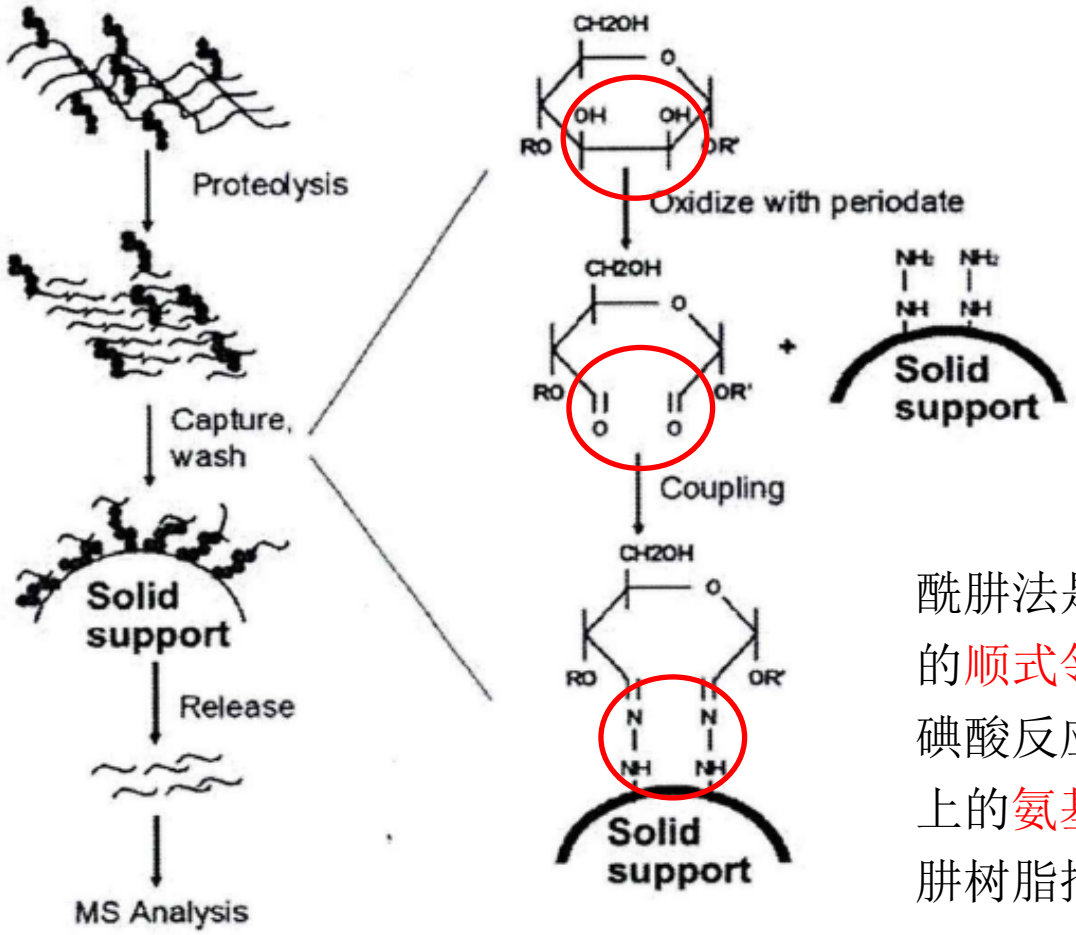
N-linked 糖基化修饰约占所用糖基化修饰的70%

为什么要要对糖蛋白/糖肽进行富集？

1、大多数**糖蛋白/糖肽的丰度远远低于非糖蛋白/非糖肽**，因此很难被质谱选中分析；

2、由于糖蛋白/糖肽段的**离子化效率**远远低于非糖蛋白/非糖肽段，非糖蛋白/非糖肽段的大量存在，导致复杂体系中**糖蛋白/糖肽段的信号被严重抑制**，从而降低了被鉴定的可能性。

常用的富集方法：酰肼法



“top down”
富集糖蛋白

酰肼法是利用糖蛋白或糖肽糖链上的顺式邻二羟基结构(cis-diols)与高碘酸反应生成醛，醛基与酰肼树脂上的氨基反应形成腙键，从而被酰肼树脂捕获。

常用的富集方法：凝集素法（buttom up）

凝集素：一类糖蛋白，能够专一性地识别特定的单糖结构、糖基序列或糖苷键，并与之可逆结合。

刀豆蛋白A (concanavalin A, Con A)

-与α-甘露糖的亲和作用最强, 常用来富集高甘露糖型的N-糖蛋白;

麦胚凝集素(wheat germ agglutinin, WGA)

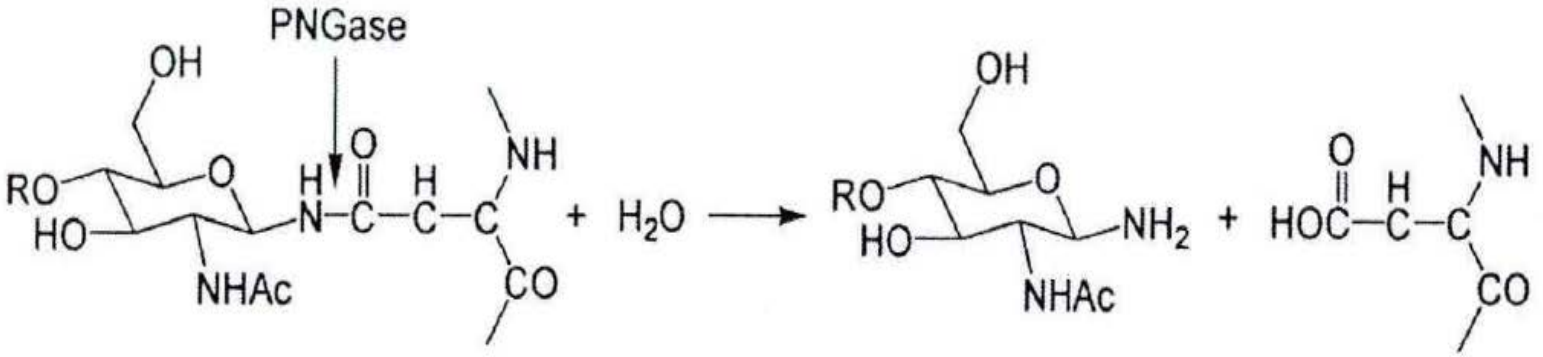
-特异性地结合乙酰葡糖胺和唾液酸,常用于复杂型N-糖蛋白的分离。

RCA120

-特异性识别非还原端具有Galβ1, 4GlcNAc结构的寡糖

多种凝集素组合使用，提高富集效率。

PNGase F酶



Asn (114.043 Da)→Asp (115.027 Da)　0.98 Da

Deamidation 自发脱酰胺　0.98 Da

$H_2{}^{18}O$　　**2.98 Da**

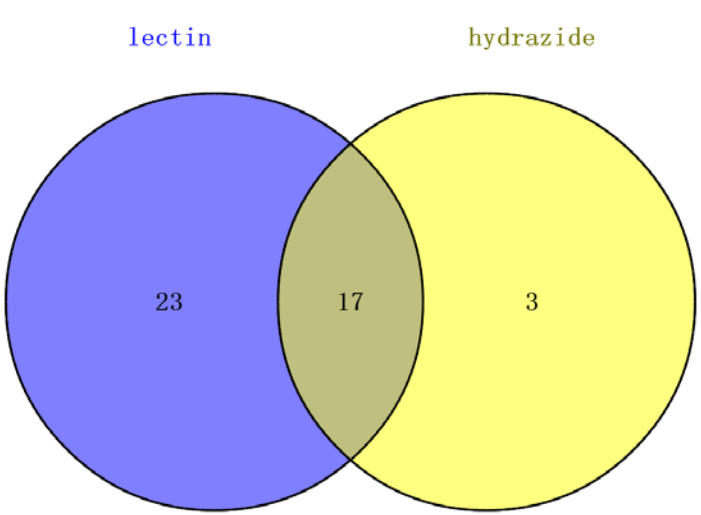
主要研究内容

--中蜂和意蜂蜂王浆N-糖基化修饰蛋白质组比较分析；

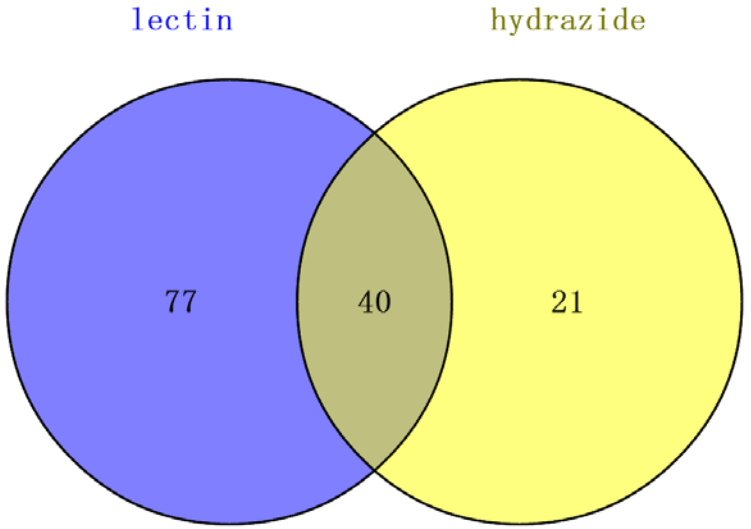
--蜂王浆主蛋白抑菌实验；

--蜂王浆主蛋白的小鼠平滑肌细胞实验。

两种富集方法具有互补性，提高了N-糖蛋白和N-糖位点鉴定的覆盖率



N-糖蛋白



N-糖位点

中蜂浆

扩展了蜂王浆蛋白N-糖基化修饰的信息

1、意蜂浆

80个N-糖蛋白，190个N-糖位点；其中新蛋白和新位点分别为23和35；

2、中蜂浆

43个N-糖蛋白，138个N-糖位点信息；其中新蛋白和新位点分别为21和138。

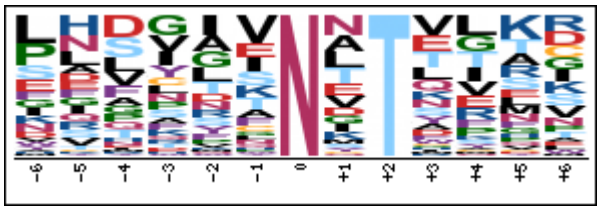
发现新的特征MOTIF

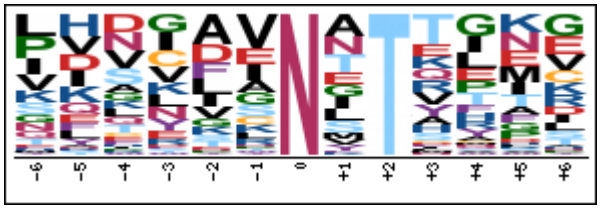
N-X-S



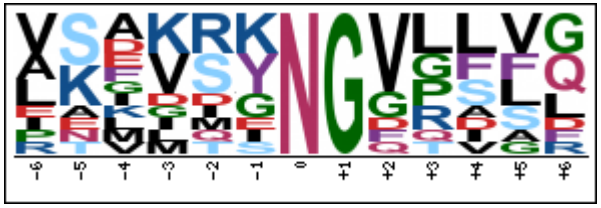


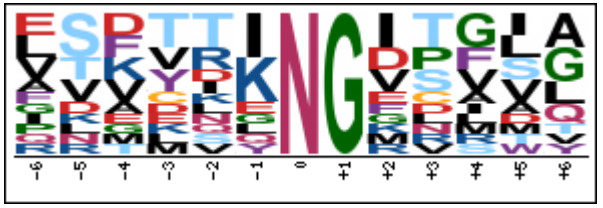
N-X-T



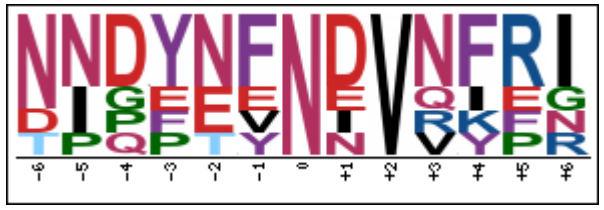


N-G-X





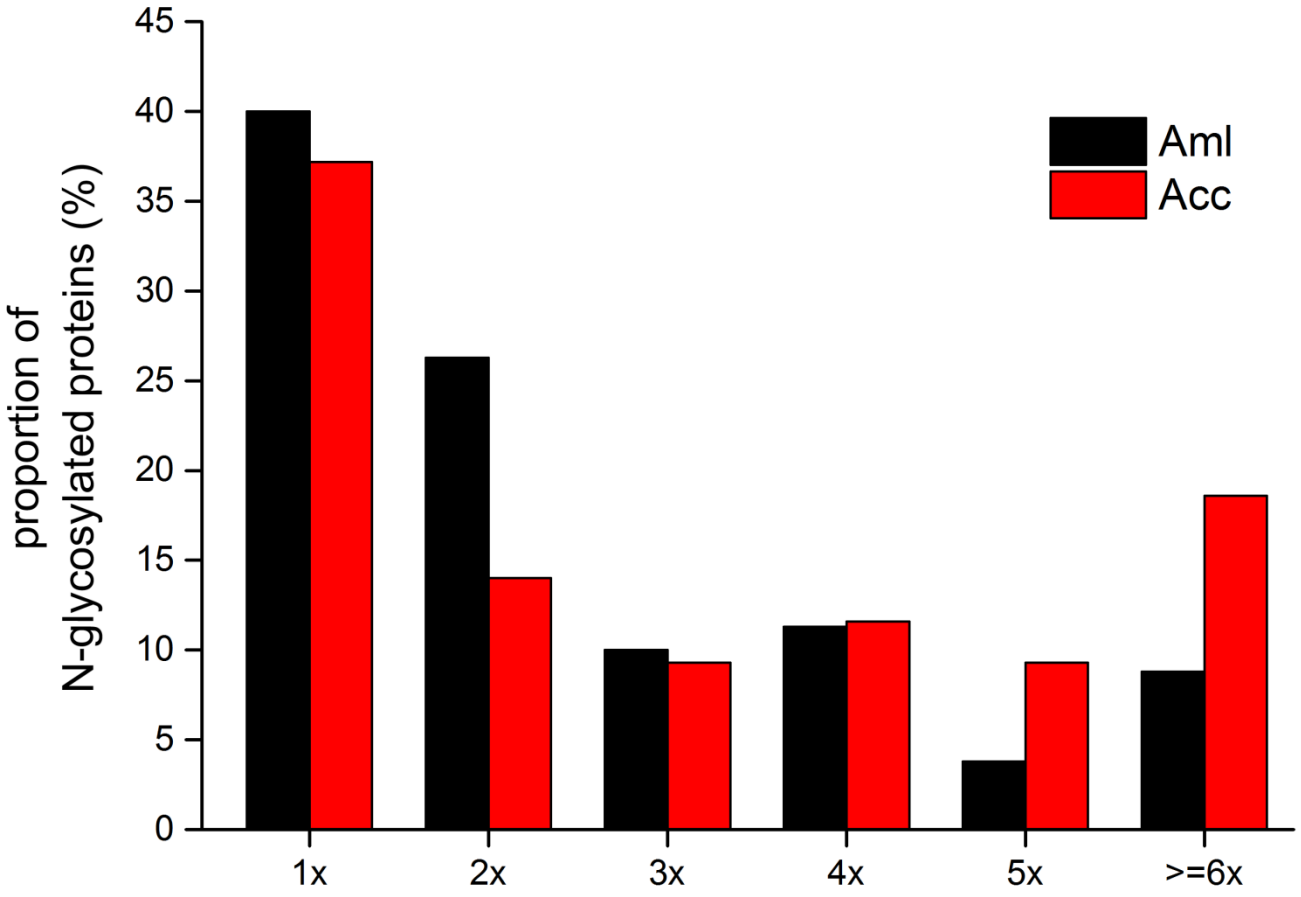
N-X-V



意蜂

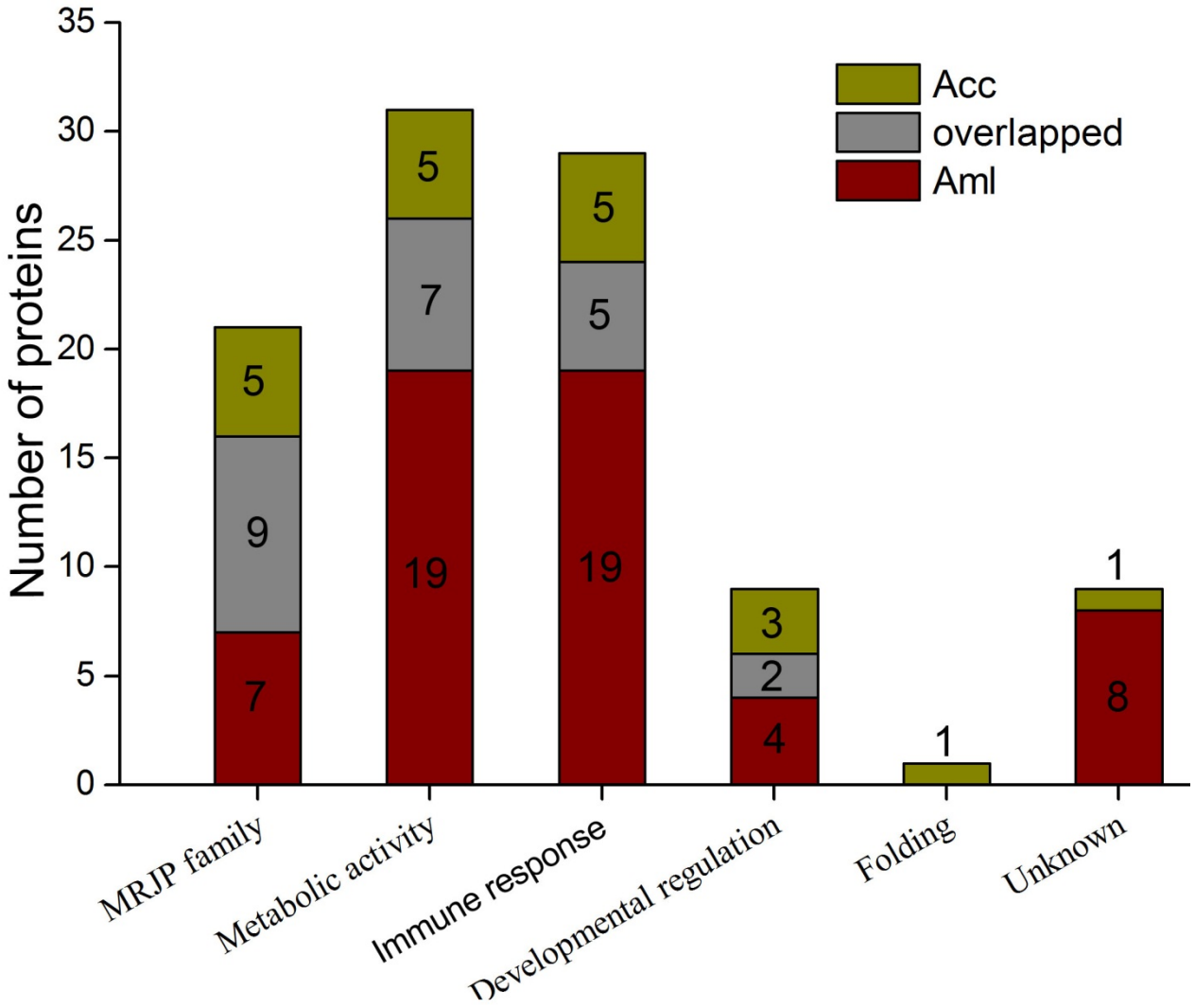
中蜂

N-糖基化修饰蛋白位点分布



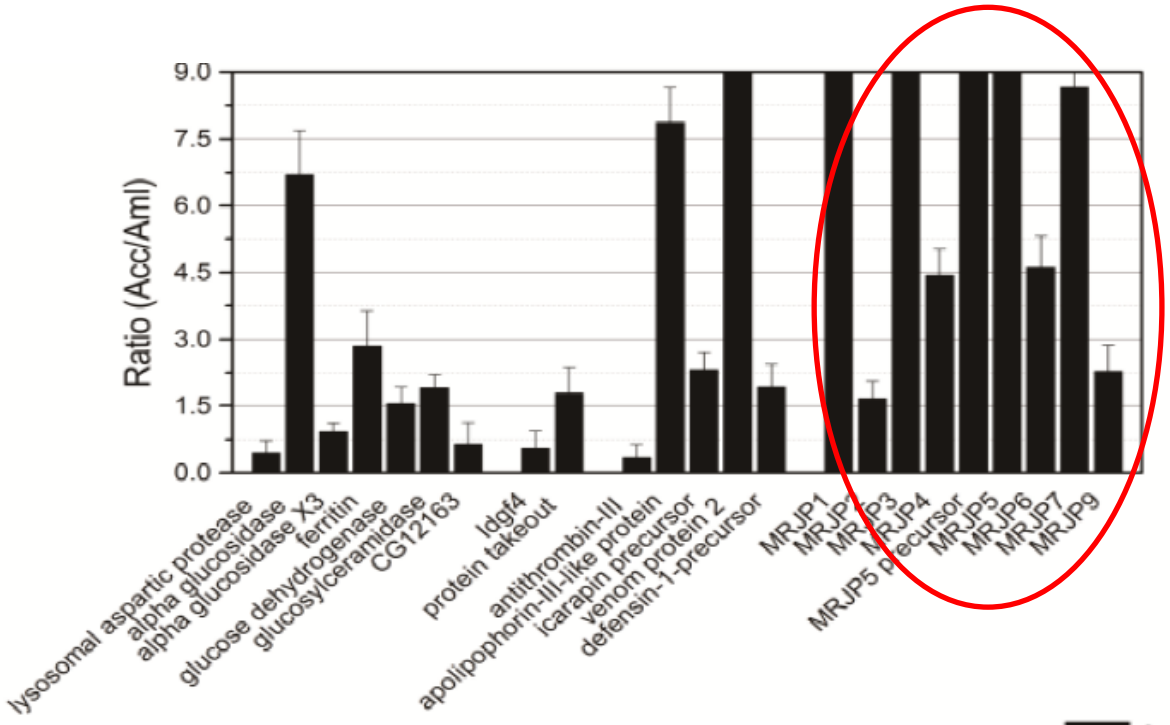
中意蜂蜂王浆具有不同的糖基化修饰状态。

N-糖基化蛋白分类

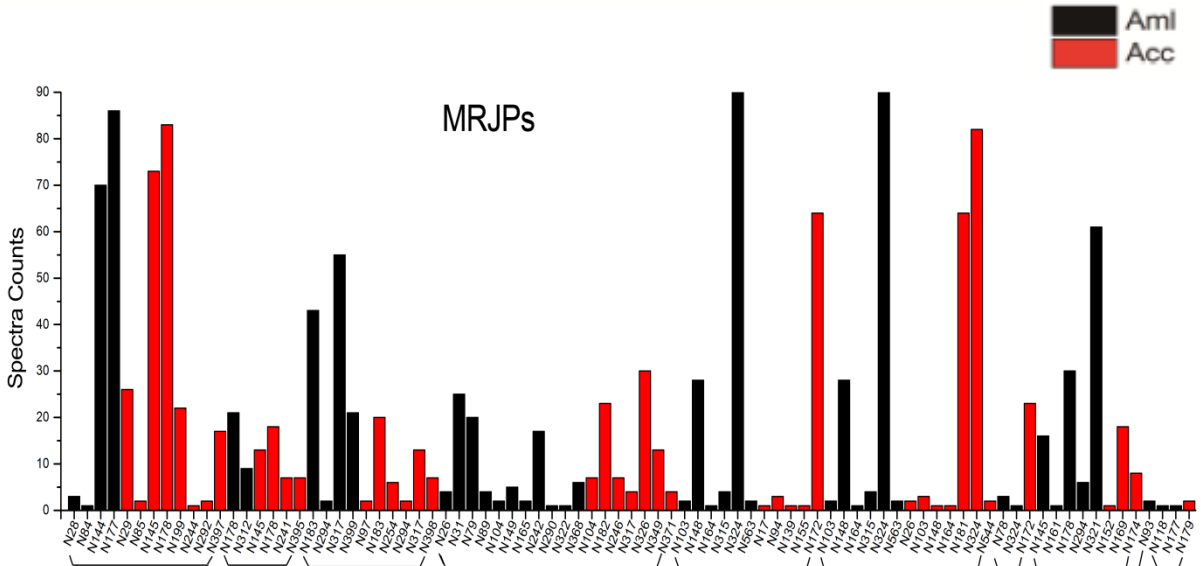


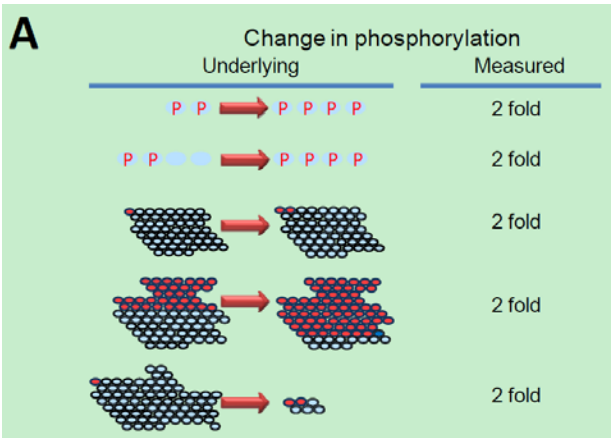
蛋白类别相似，但意蜂蛋白数量多。

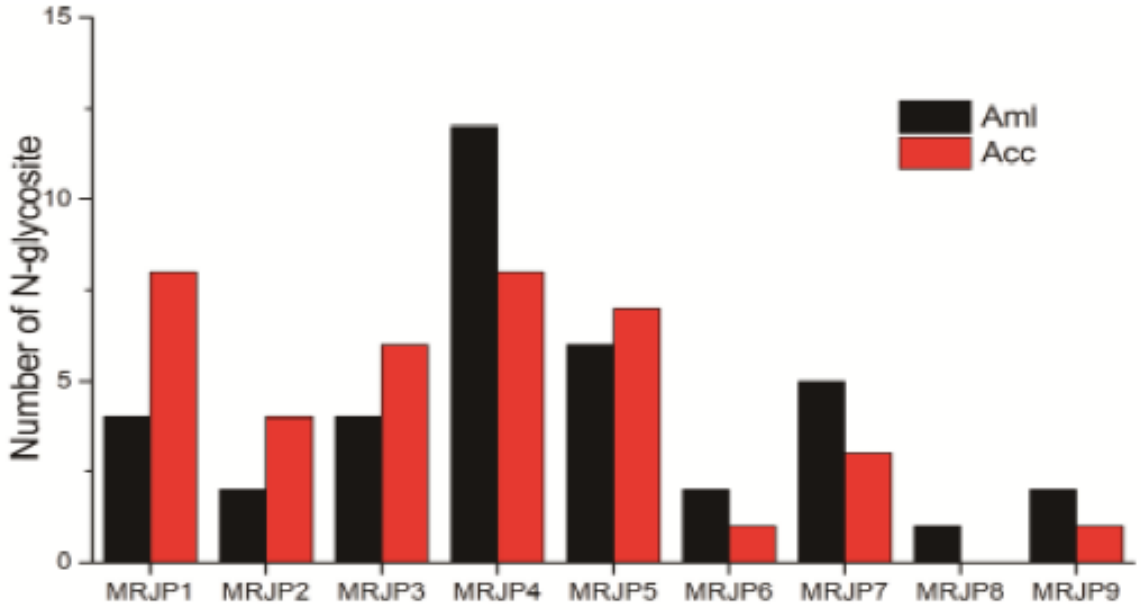
蜂王浆主蛋白



-MRJPs' cellular activities and functions might be independently regulated via glycosylation at distinct sites (Huttlin et al. 2010).
-two bee species have evolved species-specific glycosylation strategies to satisfy their own biological demands as nutrition and defense agents.



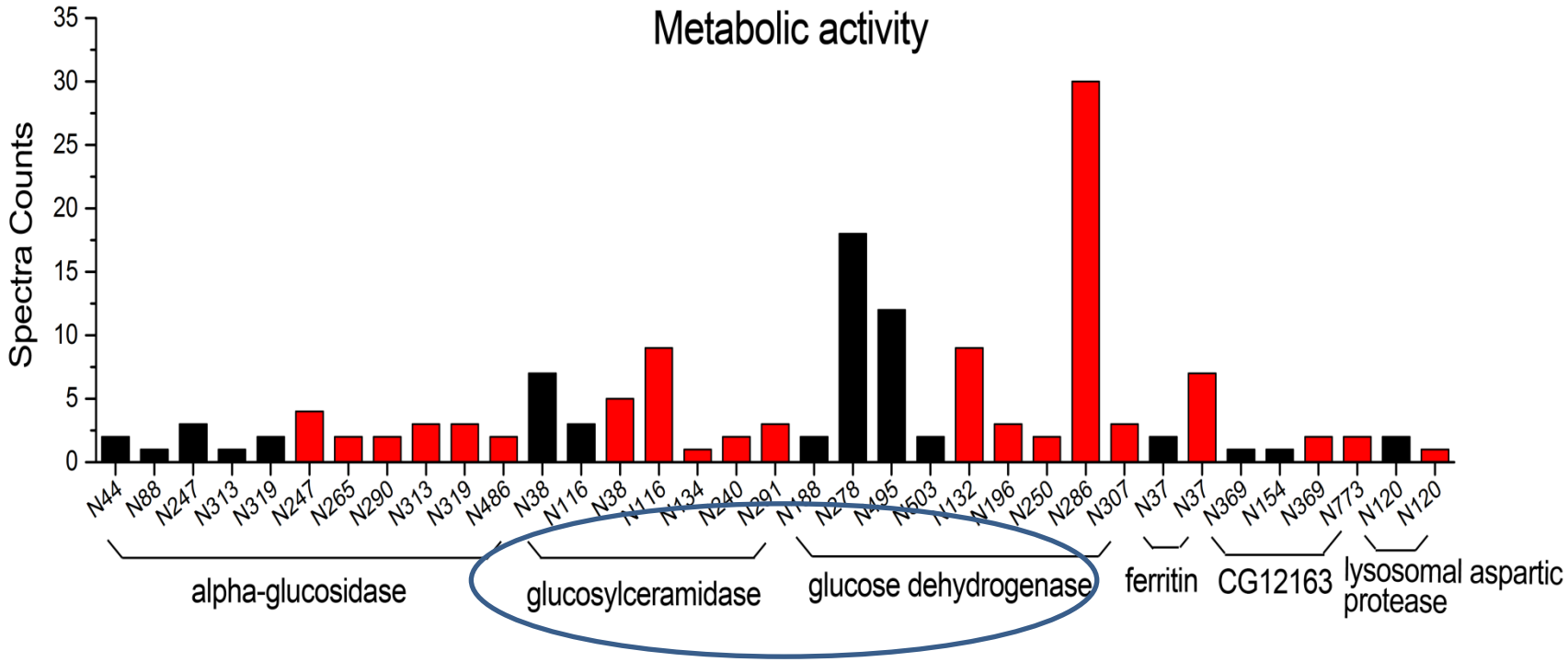




- To increase protein solubility of MRJPs (Tams et al. 1999) so as to improve the assimilation efficiency of honeybee larvae (Zhang et al. 2014).
- To achieve biological missions such as the developmental regulation of the honeybee brain (Garcia et al. 2009), or boosting the immunity of the young larvae (Bíliková et al. 2009).

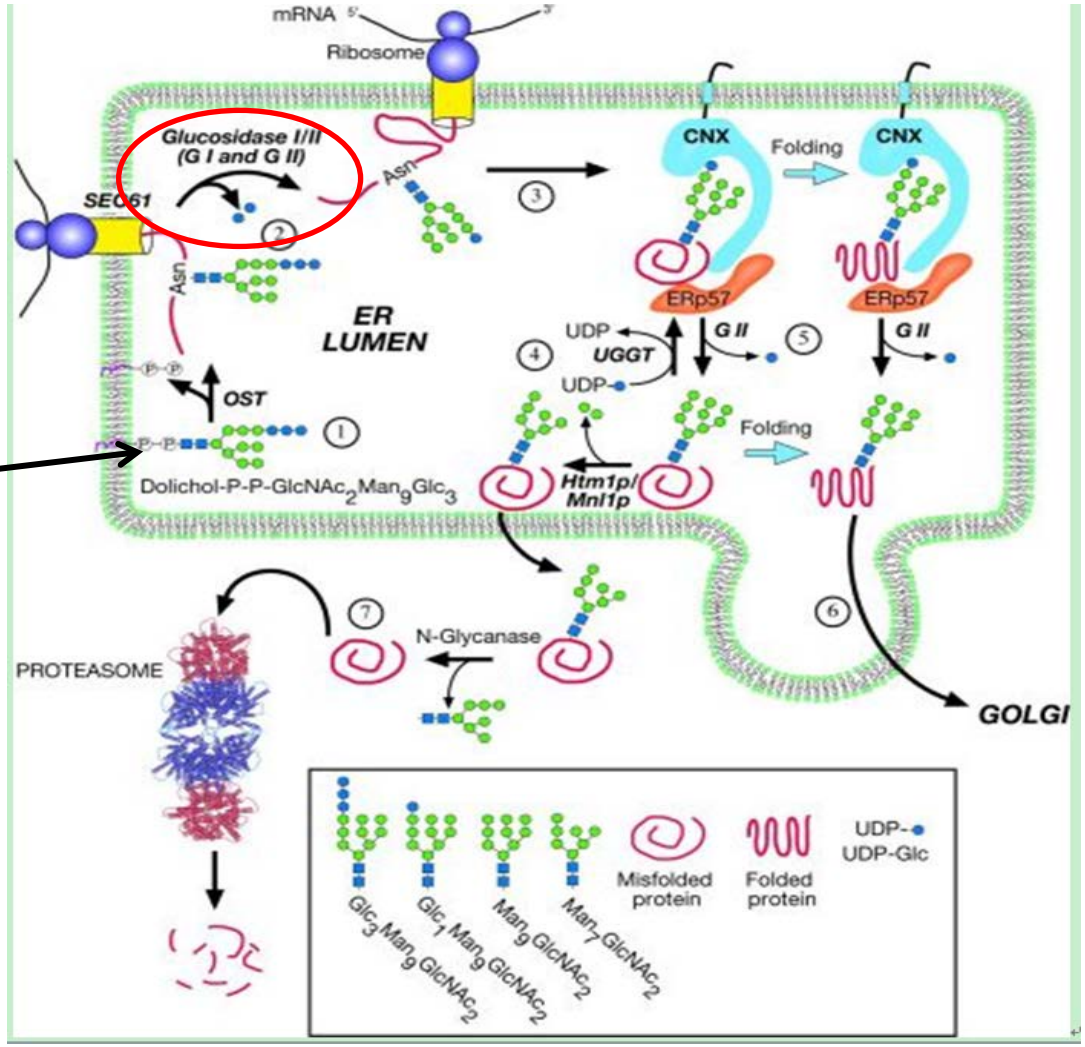
N-glycosylation 参与代谢过程中酶活性调节

Glycosylation regulates the enzymatic processing by attaching the glycans to peptide backbones and then **influencing the enzymatic activities** (Nyberg et al. 1999).



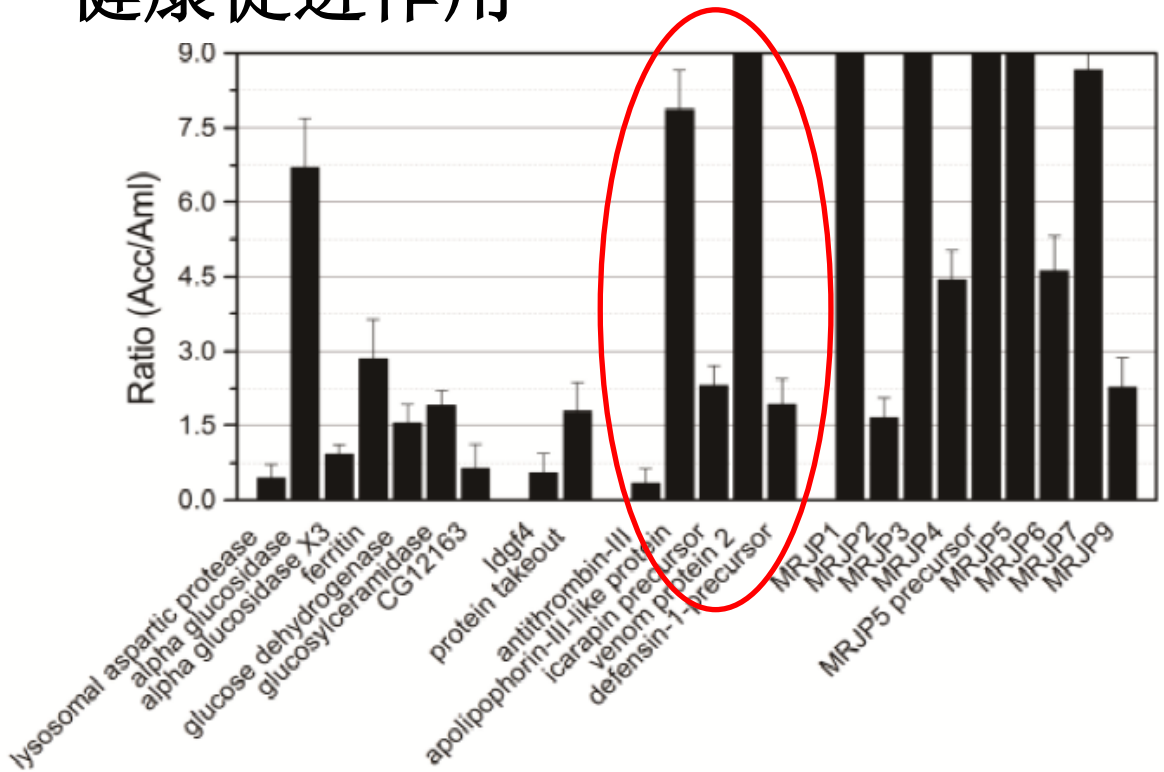
α-glucosidases I and II (G I /G II)

14 C 的前体



参与调节蛋白质的折叠和糖链的延伸。

N-glycosylated 蜜蜂幼虫的免疫调节作用和对人的健康促进作用



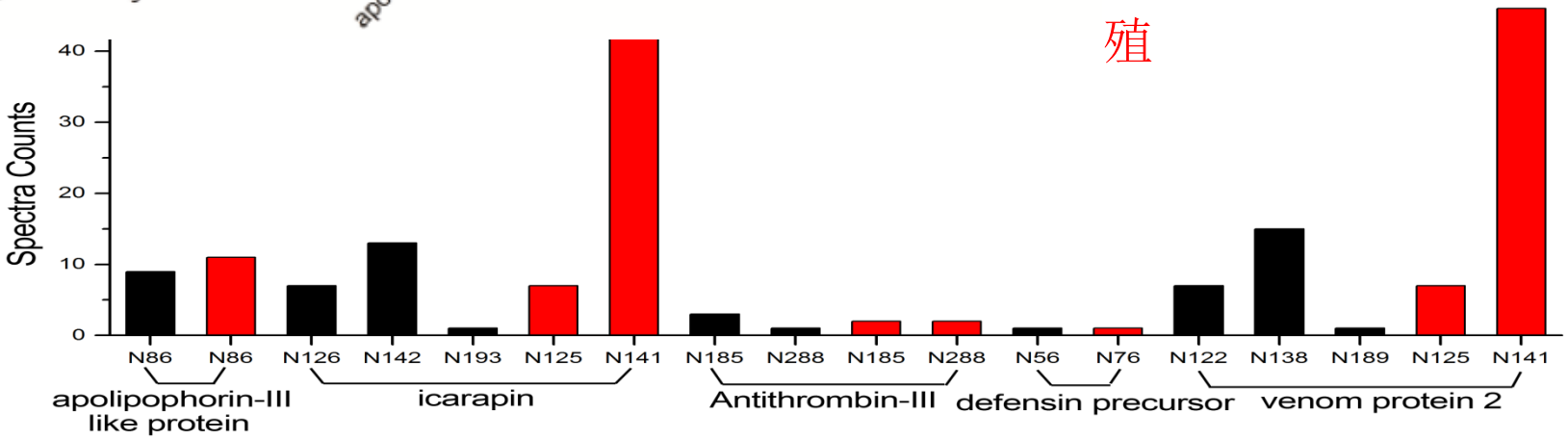
Defensin: 抗G+和 fungi；

Apidaecin：抗G+和 *P. larvae*.;

Hymenoptaecin: G+、G-、和 *P. larvae*.;

Apolipophorin III：促进免疫，抗 G+、G-和 fungi；

Regucalcin：抑制癌细胞增殖

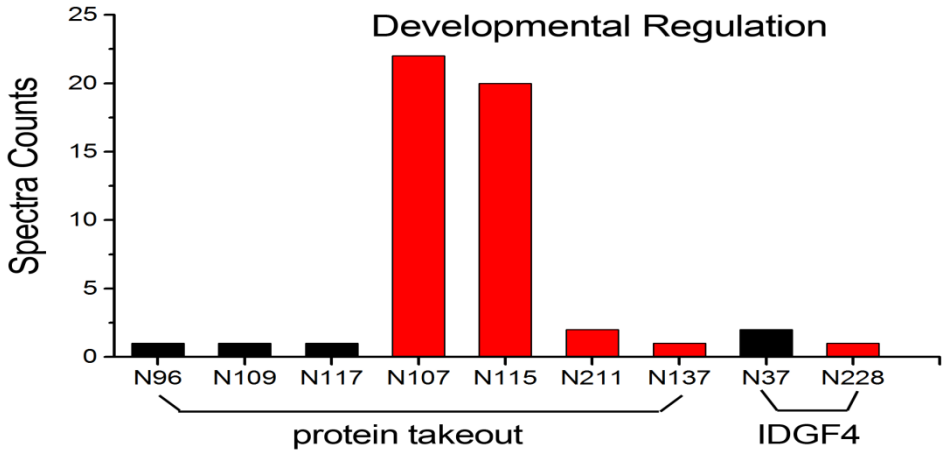


N-glycosylated RJ proteins enhance honeybee immunity and healthy promotion activities

Glycosylation may： 1) act as a molecular switch to modulate a protein's activity on or off (Dallas et al. 2012);

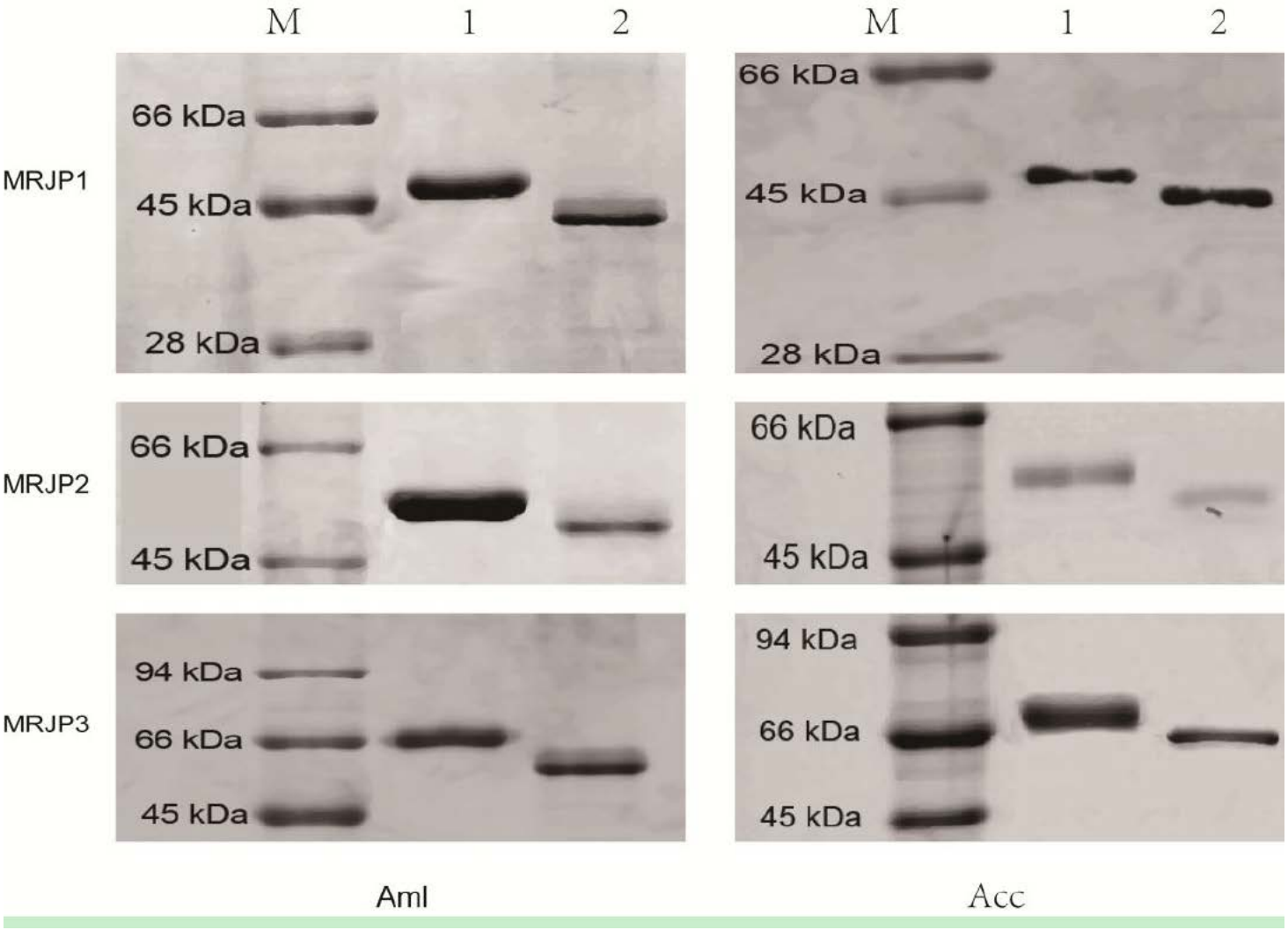
2) protect the bioactive proteins and peptides from digestion, and allow them to remain their intact form for the performance of bioactive activities (Lis and Sharon 1993).

N-glycosylation 参与发育调节



- Glycosylation modification can act as a **regulatory switch** to modulate the function of protein activity of developmental regulators.
- **Protein takeout**: link between circadian rhythms and feeding behavior.
- **Laccase**: participates in the pigmentation and sclerotization of newly synthesized cuticle, help the honeybee brood ecdysis.

MRJP1-3的分离纯化和脱糖基化



MRJP1-3的抑菌实验

Microorganism		MIC50 (uM)								
	MRJP1-Aml/Acc			MRJP2-Aml/Acc			MRJP3-Aml/Acc		
	glycosyalted	deglycosylated	glycan	glycosyalted	deglycosylated	glycan	glycosyalted	deglycosylated	glycan
Staphylococcus aureus	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N
Bacilus subtilis	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N
P. larvae	N/N	N/N	N/N	25±1.36/ 13±1.18	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N

1、糖基化修饰的MRJP2 对P. larvae（美洲幼虫腐幼病的病原菌）具有抑制性；

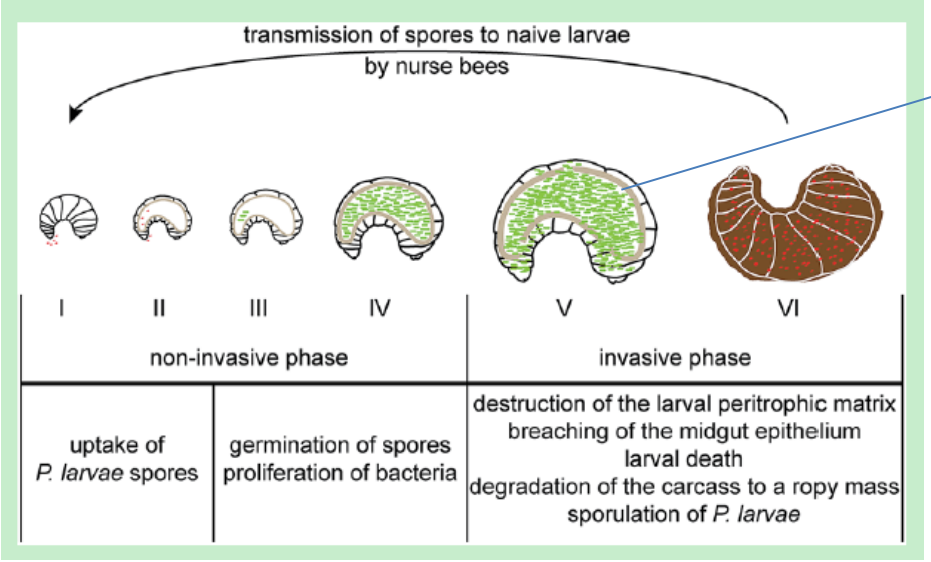
2、中蜂MRJP2的抑制效果优于意蜂。

中蜂对美洲幼虫腐幼病抵抗力强的原因？

1、中蜂糖基化修饰的MRJP2对*P. larvae* 的抑制能力强于意蜂；

2、两种对抑制P. larvae起主要作用的抗菌肽apidaecin和hymenoptaecin 只在中蜂浆鉴定到；

3、leucine-rich repeat-containing protein：促进围食膜的发育，只在中蜂浆中发现。



围食膜

高血压

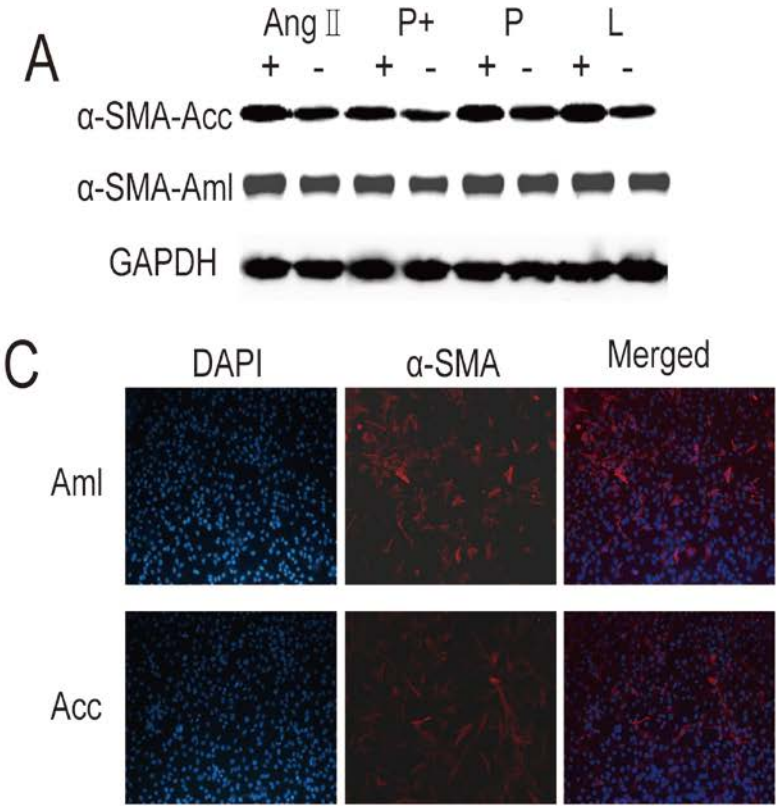
1、**高血压**是心血管疾病如心力衰竭和冠心病等主要诱因。

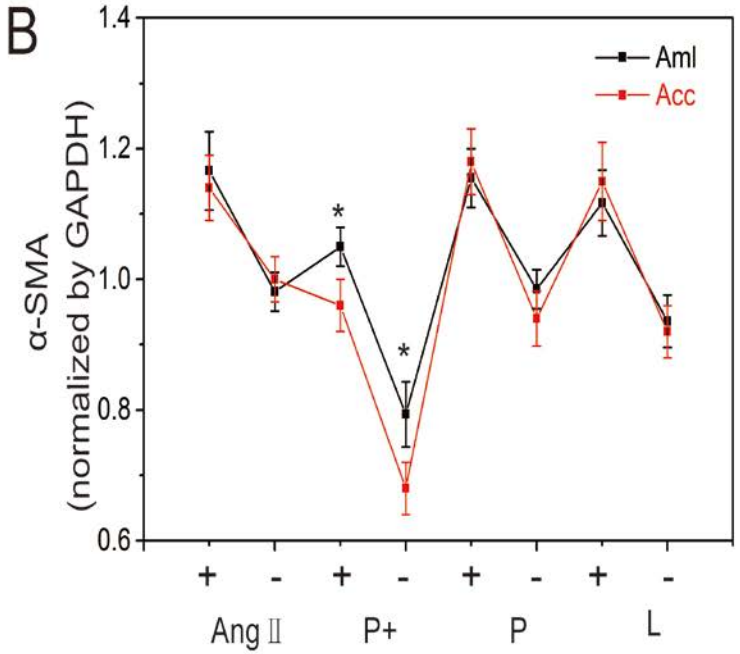
2、血管平滑肌细胞(VSMC)的增殖是高血压病理基础之一。

3、VSMC的迁移可导致血管内膜中VSMC的大量积聚和结缔组织的形成，进而促进新生内膜形成和动脉粥样硬化，继而引发高血压。

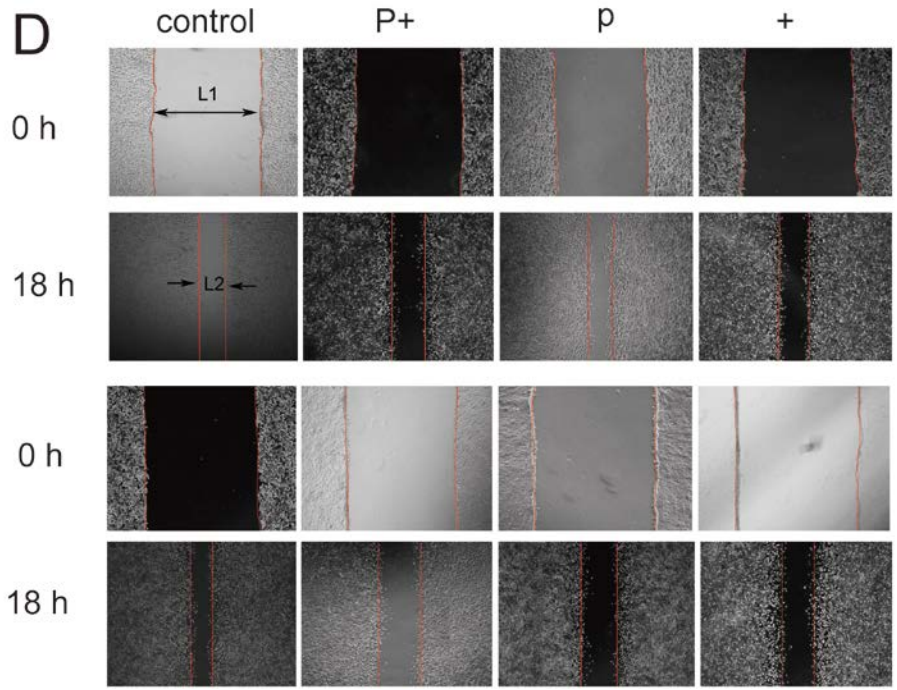
4、血管紧张素II（AngII）能诱发产生高血压，**是制备高血压模型广泛使用的诱导剂之一**。

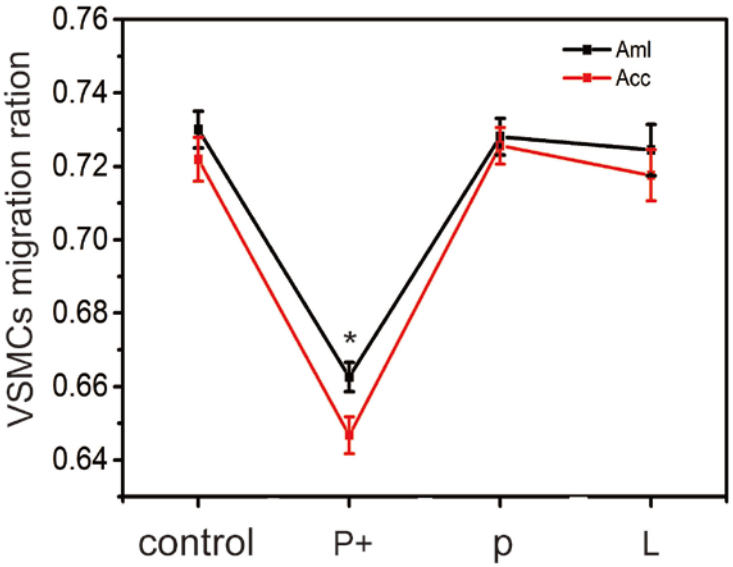
N-glycosylated MRJP1能抑制VMSC的增殖





N-glycosylated MRJP1能抑制VMSC的迁移





N-glycosylated MRJP1具有抗高血压的功效

中蜂优于意蜂

小 结

- 中蜂意蜂形成了基于物种差异性（**Species-specific**）的蜂王浆蛋白的**N-**糖基化修饰特征，用于满足各自的营养需求、免疫调控和发育调节；
- **N-**糖基化修饰参与调控**MRJP1**和**MRJP2**抗高血压活性和抑菌活性（*P. larvae*）；
- 中蜂蜂王浆**N-**糖基化修饰的**MRJP1**和**MRJP2**的抗高血压活性和抑制*P. larvae*优于意蜂浆。

欢迎批评指正！