بررسی تغییرات پروتئین‌های غدد شیری زنبورعسل در سنین مختلف رشد به روش الکتروفورز ژل پلی‌اکریل آمید سدیم دودسیل سولفات

یعقوب سیاوشی[۱]، محمدرضا بحرینی بهزادی[۱*] و محمد بهجتیان اصفهانی[۲]

[۱] یاسوج، دانشگاه یاسوج، دانشکده کشاورزی، گروه علوم دامی

[۲] کرج، دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، گروه علوم دامی

تاریخ دریافت: ۹۵/۴/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۶/۳/۲۰

ONLINE FIRST

چکیده

آنزیم‌های گوارشی آلفا گلوکز اکسیداز، آمیلاز و گلوکز اکسیداز که از مهم‌ترین پروتئین‌ها در غدد شیری زنبورهای جستجوگر می‌باشند به همراه سه پروتئین دیگر به‌عنوان پروتئین‌های اصلی برای ساخت ژله رویال، در زنبورهای کارگر پرستار بیان می‌شوند. با توجه به این‌که بیان متفاوت این پروتئین‌ها در سنین مختلف، موجب پردازش ساختار عسل و تولید ژله رویال می‌شود، هدف از این پژوهش بررسی این تغییرات در سنین مختلف بود. برای این منظور استخراج پروتیئن‌های غدد شیری با چهار روش تریس، فسفات، تری‌کلرواسیداستیک و فنل بررسی و سپس با سه روش رنگ‌آمیزی کوماسی بریلیانت بلو آر ۲۵۰، نیترات نقره و کوماسی بریلیانت بلو جی ۲۵۰ ارزیابی شد. پس از تعیین بهترین روش استخراج و رنگ‌آمیزی، پروتئین‌ها با روش برادفورد هم‌غلظت شدند و بیان آنها در پنج دوره سنی تولد، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ روزگی بررسی گردید. نتایج نشان داد که بالاترین میزان بیان پروتئین‌های غدد شیری مؤثر در ژله رویال، مربوط به سن ۱۰ روزگی و کمترین میزان بیان پروتئین‌ها مربوط به ۲۰ روزگی بود. بیش‌ترین میزان بیان در پروتئین‌های مؤثر در تولید عسل در گلوکز اکسیداز و در ۲۰ روزگی و کمترین میزان بیان در پروتئین‌های بیان شده در پروتئین آمیلاز و گلوکز اکسیداز در سنین تولد، ۵ و ۱۰ روزگی بود. همچنین بیشترین حجم بیان پروتئین‌های اصلی ژله رویال مربوط به سنین ۵ و ۱۰ روزگی بود. به نظر می‌رسد که تفاوت‌های زیاد در نرخ بیان پروتئین‌ها در سنین مختلف، یکی از مهم‌ترین عوامل مؤثر در کیفیت و کمیت عسل و ژله رویال در زنبورعسل باشد.

واژه‌های کلیدی: الکتروفورز، زنبورعسل، غدد شیری

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۷۴۳۳۲۲۴۸۴۰ ، **پست الکترونیکی:** bahreini@yu.ac.ir

مقدمه

گونه آپیس ملیفرا، به‌عنوان زنبورعسل بومی سراسر مناطق اروپا به شمار می‌رود و در ایران در مناطق غربی پراکنده است (۲). در بیش‌تر جوامع حشرات، اثر متقابلی میان حشرات نوزاد و بالغ وجود دارد که مهم‌ترین بخش این اثر مربوط به غدد می‌باشد (۱۳). غدد شیری خاص بال غشاییان بوده و در زنبورهای عسل، به شکل اندام ترشحی زوج و به‌صورت دوطرفه در منطقه جلویی سر، درون صفحه هیپوفارنیکس جای گرفته و عامل اصلی تولید مواد غذایی نوزادان یا ژله رویال می‌باشند (۶ و ۱۹). براساس پژوهش‌های صورت گرفته، سن زنبور کارگر یک نشانه تأثیرگذار روی فعالیت غدد شیری می‌باشد (۹). غدد شیری در زنبورهای کارگر در سن ۱۲-۴ روزگی فعال‌شده و باعث تولید ژله رویال در زنبورهای عسل کارگر پرستار، به‌منظور تغذیه ملکه در تمام دوران زندگی او و تغذیه لاروها و کارگرها در سه روز اول رشد آن‌ها به کار می‌رود (۱۵). بر پایه پژوهش‌های صورت گرفته ثابت‌شده که

Archive of SID

www.SID.ir

پروتئین‌های متفاوتی از غدد شیری زنبورها در سنین مختلف ترشح می‌شوند (۱۰). پروتئین‌های شناخته‌شده در غدد شیری زنبورهای عسل شامل آلفا گلوکز اکسیداز، گلوکز اکسیداز و آمیلاز می‌باشند که فعالیت‌های گوارشی از خود نشان داده و در زنبورهای عسل جستجوگر به‌منظور پردازش شهد به عسل به کار می‌روند. هم‌چنین این پروتئین‌ها نقش مهمی را در ایجاد خاصیت ضدعفونی‌کنندگی عسل ایفا می‌کنند (۱۰). درواقع عملکرد غدد شیری در زنبورهای جستجوگر بسیار تخصصی است و بیان ژن آنزیم‌های سوخت‌وساز کربوهیدرات ازجمله آمیلاز، گلوکز اکسیداز و آلفا گلوکز اکسیداز که برای پردازش شهد به عسل موردنیاز است براساس تغییرات نقش وابسته به سن زنبورعسل کارگر انجام می‌شود (۱۶). بنابراین به نظر می‌رسد که سلول‌های غدد شیری دارای دو حالت متمایزند که مطابق با الگوی بیان پروتئین در سنین مختلف رشد کارگر و با توجه به تغییر نقش آن‌ها در سنین مختلف، بیان می‌شوند (۱۶). سه پروتئین دیگر با وزن مولکولی ۵۰، ۵۶ و ۶۴ کیلودالتون به‌عنوان پروتئین‌های اصلی جهت ساخت ژله رویال، در غدد شیری زنبورهای کارگر پرستار بیان می‌شوند (۱۰ و ۱۴). هم‌چنین دو پروتئین دیگر نیز با نام‌های آلفا گلوکز اکسیدازI و آلفا گلوکز اکسیدازII در غدد شیری زنبورهای جستجوگر وجود دارد که دارای وزن مولکولی ۹۸ و ۷۶ کیلو دالتون می‌باشند (۲۱). در حقیقت پروتئین‌های بسیاری در غدد شیری زنبورعسل وجود دارد که هرکدام بنا بر وظایفی که بر عهده دارند در سنین مختلف بیان می‌شوند و موجب عملکرد طبیعی زنبورهای عسل در کلنی می‌گردند. از طرفی بیان متفاوت این پروتئین‌ها در غدد شیری زنبورعسل در سنین مختلف، موجب پردازش ساختار عسل و تولید ژله رویال می‌شود. با توجه به این‌که تعداد و نوع پروتئین‌های موجود در غدد شیری زنبورعسل و همچنین میزان بیان آن‌ها در مراحل مختلف رشد و نمو زنبورعسل متفاوت است، این پژوهش باهدف بررسی تغییرات کمی و کیفی پروتئین‌های موجود در غدد شیری سنین مختلف زنبورعسل بود.

مواد و روشها

برای تولید زنبورهای یک‌روزه از کلنی‌هایی که از نظر ژنتیکی یکسان‌سازی شده بودند استفاده گردید. برای این منظور از ملکه‌های خواهری که همگی از یک مادر متولد شده بودند، استفاده شد. این ملکه‌ها به‌صورت سفارشی و توسط شرکت اسپادانا مکمل تولید شدند، به‌طوری که همگی یک والد مشترک داشته و از روش پیوند زدن تخم-های یکسان و پرورش آنها در فنجانک‌های تولید شده به روش مصنوعی درون کندوچه‌های پرستار به وجود آمدند (۷).

زنبورها در کل دوره آزمایش درون کندوچه‌های چوبی نگهداری و دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند و از یک جیره غذایی مخلوط عسل و پودر شکر تغذیه شدند. پودر شکری که به‌منظور تهیه کیک جانشین استفاده شد، کاملاً پودر شده و از الکی بامش ۱۴۰ عبور داده شد. عسل نیز پیش از استفاده، درحمام آب گرم به مدت نیم ساعت در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد گرم شد تا در صورت آلودگی باکتریایی، آلودگی بدین صورت حذف و گرانروی آن کاهش یابد. آزمایش در شرایط گرم‌خانه‌گذاری با شرایط دمایی (۱±۳۳ درجه سانتی‌گراد) و رطوبت کنترل‌شده (۱±۶۵ درصد) انجام شد (۶).

زنبورهای کارگر مورد آزمایش شامل ۵ کندوچه حاوی ۱۵۰ عدد زنبور یک‌روزه بودند که پس از اتمام دوره در هر رده سنی (تولد، روز پنجم، روز دهم، روز پانزدهم و روز بیستم) از هرکدام ۲۰ عدد زنبور به‌صورت تصادفی انتخاب شد و به‌منظور استخراج غدد شیری، با قراردادن روی یخ بی‌حس شده و سپس غدد شیری آنها توسط برش در منطقه جلویی سر و برداشتن پوست پیشانی در زیر استریومیکروسکوپ استخراج شد (۱۲ و ۲۰). به‌منظور

Archive of SID

www.SID.ir

استخراج پروتیئن‌های غدد شیری، چهار روش تریس، فسفات، تری کلرو اسیداستیک و فنل مورد بررسی قرارگرفت. سپس غدد شیری استخراج شده به روش پاوکوی و همکاران (۲۰۱۲) آماده‌سازی شد. در ادامه غلظت پروتئین‌های آنها با روش برادفورد و پروتئین‌های استاندارد سرم آلبومین گاوی تعیین و تمام پروتئین‌ها هم‌غلظت شدند (۳ و ۱۸).

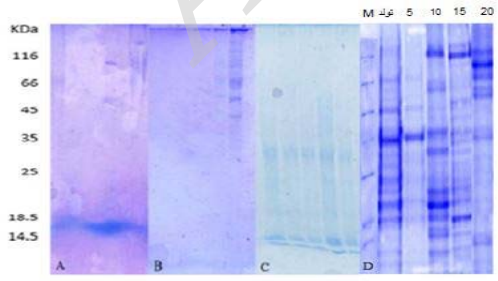
جهت تفکیک پروتئین‌ها از روش الکتروفورز ژل پلی-اکریل‌آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات (SDS) استفاده شد. برای سدیم دودسیل سولفات معمولی (یک‌بعدی دارای چاهک) از دو ژل متمرکز کننده (۵ درصد) و ژل جداکننده (۱۲/۵ درصد) استفاده شد. پس از آماده‌سازی ژل، نمونه‌ها در بافر رنگ (برومو فنول بلو، گلیسرول، اوره، سدیم دودسیل سولفات، تریس اچ-سی-ال ۱/۵ مولار با اسیدیته ۸ و بتامرکاپتواتانول) به مقدار ۳۰ میکرولیتر از هر نمونه با غلظت یکسان روی ژل بارگذاری شد. الکتروفوز با ولتاژ ۹۰ ولت در ژل متمرکز کننده به مدت ۲ ساعت و با ولتاژ ۲۵۰ ولت در ژل جداکننده به مدت ۳ ساعت انجام شد (۱). برای رنگ‌آمیزی ژل، سه روش مختلف کوماسی بریلیانت بلو آر ۲۵۰، نیترات نقره و کوماسی بریلیانت بلو جی ۲۵۰ ارزیابی شد. پس از ظاهر شدن باندها، اتمام رنگ‌آمیزی به کمک محلول خاتمه‌دهنده و تثبیت رنگ به کمک محلول اسید استیک ۱۰ درصد انجام شد (۱۶).

پس از اتمام ژل‌گذاری، باندهای حاصله از لحاظ تنوع و غلظت مورد مقایسه قرارگرفتند. در این مطالعه نرم‌افزارهای Gelanalyzer و ImageJ برای آنالیز داده‌های مولکولی و تعیین غلظت باندهای حاصل استفاده گردید. سپس با استفاده از نرم‌افزار SPSS و روش آزمون چند دامنه دانکن تفاوت بین میانگین‌ها مقایسه گردید.

نتایج و بحث

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از بررسی چهار روش استخراج پروتئین، روش فنول به‌عنوان بهترین روش استخراج پروتئین تعیین شد. لازم به ذکر است که کیفیت و کمیت پروتئین استخراج شده تأثیر بسیار زیادی درروند بررسی پروتئین‌ها دارد و همچنین نوع روش استخراج تأثیر به‌سزایی در کیفیت و کمیت پروتئین‌های استخراج شده خواهد داشت. در بررسی‌های کیفیت‌سنجی با استفاده از روش برادفورد، کیفیت باندهای پروتئینی حاصل، درروش فنول دارای بالاترین میزان نسبت به دیگر روش‌ها بودند. در مقایسه‌ای که توسط پاوکوی و همکاران (۲۰۱۲) میان سه روش مختلف استخراج پروتئین ازجمله روش فنول، تری کلرواسیداستیک و استون انجام شد، روش فنول حداکثر کمیت استخراج پروتئین از بافت‌های گیاهی را داشت، که این امر با نتایج حاصل از تحقیق حاضر همسو بود (۱۷). همچنین نتایج به‌دست‌آمده از میزان پروتئین استخراج شده با سه روش مختلف در این پژوهش با نتایج کوپکه و همکاران (۲۰۱۲) که براساس برادفورد اندازه-گیری کرده بودند، مطابقت داشت (۱۱).

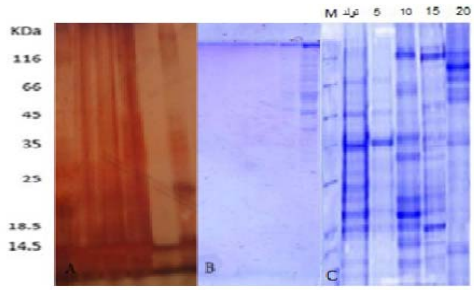
پس از به دست آوردن بهترین روش استخراج پروتئین، سه روش مختلف رنگ‌آمیزی مورد بررسی قرارگرفت که با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، روش رنگ‌آمیزی به کمک کوماسی برلیانت بلوجی ۲۵۰ بهترین وضوح را برای پروتئین‌های غدد شیری نشان داد (شکل‌های ۱ و ۲).



شکل ۱- مقایسه روش‌های مختلف استخراج پروتئین. A: استخراج به روش تریس، B: استخراج به روش فسفات، C: استخراج به روش تری کلرو اسیداستیک و D: استخراج به روش فنول

Archive of SID

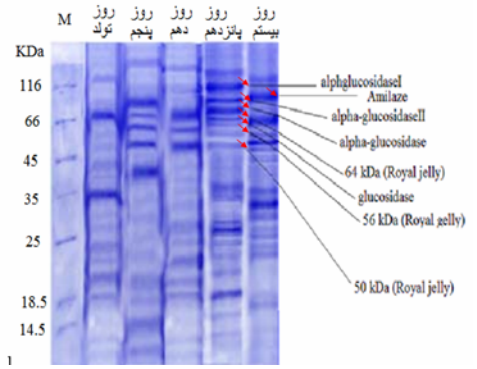
www.SID.ir



شکل ۲- مقایسه روش‌های مختلف رنگ‌آمیزی پروتئین. A: رنگ-آمیزی با روش نیترات نقره، B: رنگ‌آمیزی با روش کوماسی برلیانت بلو آر۲۵۰ ، C: رنگ‌آمیزی با روش کوماسی برلیانت بلو جی۲۵۰.

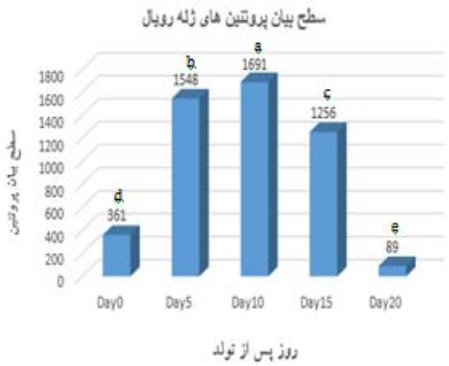
در گزارشات مرتبط به آشکارسازی پروتئین‌های مختلف غدد شیری و حفظ الگوی بیان آن‌ها در مغز زنبورهای مخملی و زنبورهای عسل نتایج مشابهی در ارتباط با بهترین روش رنگ‌آمیزی ژل پلی اکریل آمید پروتئین بدست آمده است (۱۱).

مشخص‌ترین پروتئین‌های موجود در غدد شیری زنبورعسل که در تحقیق حاضر موردمطالعه قرارگرفتند در شکل ۳ نشان داده شده است که شامل آلفا گلوکز اکسیداز، گلوکز اکسیداز، آلفا گلوکز اکسیداز I و II، آمیلاز و پروتئین‌هایی با وزن مولکولی۵۰، ۵۶ و ۶۴ کیلودالتون بودند.



شکل ۳- مکان و موقعیت پروتئین‌های شناسایی‌شده در غدد شیری زنبورعسل در روزهای متفاوت

نرخ بیان پروتئین‌های اصلی ژله رویال (۵۰، ۵۶ و ۶۴ کیلودالتون) در غدد شیری زنبورعسل در شکل ۴ نشان داده شده است.



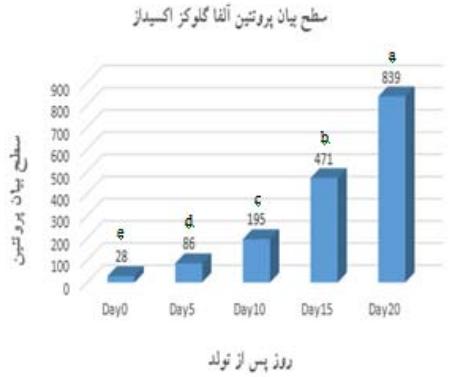
شکل ۴- نرخ بیان پروتئین‌های ژله رویال در غدد شیری زنبورعسل

نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که بیشترین حجم بیان پروتئین‌های اصلی ژله رویال مربوط به سنین ۵ و ۱۰ روزگی می‌باشد. این در حالی است که در ۱۵ روزگی میزان بیان کمتری نسبت به سنین ۵ و ۱۰ روزگی مشاهده شد. هرچند که تفاوت قابل‌ملاحظه‌ای بین سنین ۵ و ۱۰ روزگی نمایان نگردید، اما اختلاف مشخصی با ۱۵ روزگی وجود داشت ($P<0/01$). نکته جالب توجه این‌که در ۲۰ روزگی و پس‌ازآن روز تولد حداقل میزان بیان دیده شد، به‌گونه‌ای که در ۲۰ روزگی تفاوت بسیار بارزی با سایر سنین (۵، ۱۰ و ۱۵ روزگی) نمایان بود ($P<0/01$). این نکته قابل‌توجه است که با افزایش بیان یکی از این پروتئین‌ها در سنین ۵، ۱۰ و ۱۵ روزگی، دو پروتئین دیگر نیز افزایش و با کاهش بیان یکی از پروتئین‌ها در سنین تولد و ۲۰ روزگی، دو پروتئین دیگر هم کاهش پیدا کردند (شکل ۴).

نرخ بیان پروتئین آلفا گلوکز اکسیداز در غدد شیری زنبورعسل در شکل ۵ ارائه‌شده است. با افزایش سن، نرخ بیان دارای روندی صعودی بود. بطوریکه حداکثر میزان بیان پروتئین در سن۲۰ روزگی و حداقل میزان بیان در این پروتئین در زمان تولد به دست آمد. نکته جالب توجه اینکه در سنین ۵ و ۱۰ روزگی که بیان پروتئین‌های ژله رویال زیاد بود، سطح بیان پروتئین آلفا گلوکز اکسیداز کاهش بسیار چشم‌گیری نشان داد (شکل‌های ۴ و ۵).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۵- نرخ بیان پروتئین آلفا گلوکز اکسیداز در غدد شیری زنبورعسل

همانطورکه در شکل ۳ مشخص است، پروتئین آلفا گلوکز اکسیداز، با اندازه‌ی ۷۰ کیلودالتون و در ارتفاعی بالاتر از پروتئین‌های ژله رویال قرارمی‌گیرد و عملکردی کاملاً متفاوت با پروتئین‌های ۵۰، ۵۶ و ۶۴ کیلودالتون دارد. بااینکه مقدار بیان این پروتئین نسبت به سایر پروتئین‌های موجود در غدد شیری کمتر می‌باشد اما اثرات بسیار مهمی در تولید عسل ایفا می‌کند و ۵۰ درصد از کل پروتئین‌های زنبورهای جستجوگر را شامل می‌شود. در بررسی بیان ژن آلفا گلوکز اکسیداز در غدد شیری زنبورعسل شرقی نشان داده شد که تغییر غدد شیری در زنبورهای کارگر، که وابسته به سن زنبور می‌باشد منجر به تولید آنزیم‌های گوارشی ازجمله آلفا گلوکز اکسیداز می‌شود (۴ و ۵). از طرفی آلفا گلوکز اکسیداز در غدد شیری زنبورعسل کارگر درست زمانی بیان می‌شود که زنبورعسل نقش خود را از زنبور پرستار به زنبور جستجوگر تغییر داده است (۱۰). لذا این آنزیم به‌طور خاص تنها در زنبورهای جستجوگر بیان می‌شود.

نرخ بیان پروتئین‌های آلفا گلوکز اکسیدازI و آلفا گلوکز اکسیدازII در غدد شیری زنبورعسل در شکل ۶ نشان داده شده است. تغییرات بیان این دو پروتئین نسبت به سن شبیه روند تغییرات بیان پروتئین آلفا گلوکز اکسیداز بود. به این صورت که با افزایش سن، نرخ بیان نیز دارای روندی صعودی بود. یعنی اینکه بیش‌ترین حجم بیان پروتئین‌های آلفا گلوکز اکسیداز I و آلفا گلوکز اکسیدازII متعلق به سن ۲۰ روزگی و پس‌ازآن مربوط به سن ۱۵ روزگی می‌باشد. از طرفی کمینه میزان بیان در این پروتئین‌ها در سن یک-روزگی مشاهده شد. نکته جالب توجه اینکه بیان این پروتئین‌ها در سنین مختلف دارای تفاوت نسبتاً بارزی باهم بودند ($P<0/01$).

شکل ۶- نرخ بیان پروتئین‌های آلفا گلوکز اکسیدازI و II در غدد شیری زنبورعسل

همانطورکه در شکل ۳ مشخص است، دو پروتئین آلفا گلوکز اکسیدازI و آلفا گلوکز اکسیدازII به ترتیب با اندازه-های ۹۸ و ۷۶ کیلودالتون از نظر اندازه دارای طول بزرگتر از پروتئین‌های آلفا گلوکز اکسیداز، گلوکز اکسیداز و پروتئین‌های ژله رویال می‌باشند. نتایج بدست آمده از بیان ژن آلفا گلوکز اکسیداز در غدد شیری زنبورعسل شرقی نشان داد که خواص مشابهی در آلفا گلوکز اکسیدازI و آلفا گلوکز اکسیدازII موجود در سر و شکم زنبورعسل نژاد *آپیس ملیفرا* با آلفا گلوکز اکسیداز موجود در عسل وجود دارد که این امر نشان‌دهنده آن است که این آنزیم‌ها در غدد شیری زنبورهای جستجوگر ساخته‌شده و در تبدیل ساکارز شهد به گلوکز و فروکتوز نقش داشته است (۵ و ۸).

همانطورکه در شکل ۷ مشخص شده است، سطح بیان پروتئین گلوکز اکسیداز در سنین مختلف نیز دارای روندی صعودی بود. به طوریکه در سنین تولد، ۵ و ۱۰ روزگی

Archive of SID

www.SID.ir

بیانی از این پروتئین مشاهده نشد. این در حالی است که بیش‌ترین میزان بیان در این پروتئین متعلق به ۲۰ روزگی و پس‌ازآن مربوط به ۱۵ روزگی می‌باشد که بین آنها اختلاف معنی‌دار وجود داشت ($P<0/01$). همچنین این تفاوت بیان بین سن ۱۵ روزگی و سنین تولد، ۵ و ۱۰ روزگی نیز به‌صورت بارز در شکل ۷ نمایان است.

شکل ۷- نرخ بیان پروتئین گلوکز اکسیداز در غدد شیری زنبورعسل

شکل ۸- نرخ بیان پروتئین آمیلاز در غدد شیری زنبورعسل

با توجه به شکل ۳ مشخص می‌شود که پروتئین گلوکز اکسیداز از نظر اندازه دارای طول (۵۷ کیلودالتون) بسیار نزدیک به پروتئین‌های ژله رویال می‌باشد و در جایگاهی بین آن‌ها قراردارد. این پروتئین از نظر عملکرد و میزان بیان در سطوح مختلف، کاملاً متفاوت با پروتئین‌های ژله رویال عمل می‌کند و در حفظ خاصیت اسیدی عسل و ضدعفونی آن نقش به‌سزایی دارد. مقدار بیان پروتئین گلوکز اکسیداز در اندازه‌ای بیشتر نسبت به سایر پروتئین‌های موجود در غدد شیری می‌باشد. بیان آمیلاز و گلوکز اکسیداز در غدد شیری زنبورعسل کارگر *آپیس ملیفرا* با توجه به تغییر نقش وابسته به سن زنبورعسل کارگر بررسی و نشان داده شد که گلوکز اکسیداز به‌طور خاص تنها در غدد شیری زنبورهای جستجوگر بیان شده و جدا کردن آن از راه کلون کردن cDNA مربوط به دو زنبورعسل انجام شد (۱۶). نقش گلوکز اکسیداز در تبدیل گلوکز به پراکسیدهیدروژن و گلوکونیک‌اسید بوده و گلوکونیک‌اسید باعث نگهداری خاصیت اسیدی عسل شده و همراه با پراکسیدهیدروژن می‌توانند اقدام به ضدعفونی عسل کنند. درنتیجه حضور این آنزیم در زنبورهای جستجوگر برای تبدیل شهد به عسل ضروری هستند (۱۰).

روند نرخ بیان صعودی پروتئین آمیلاز در سنین مختلف در شکل ۸ نشان داده شده است. همانطورکه مشاهده می‌شود، بیشترین میزان بیان پروتئین آمیلاز متعلق به سن ۲۰ روزگی و پس‌ازآن با تفاوت زیاد در سن ۱۵ روزگی است. این در حالی است که عدم بیان پروتئین آمیلاز در سنین تولد و ۵ و ۱۰ روزگی مشاهده گردید.

پروتئین آمیلاز با وزن مولکولی ۸۵ کیلودالتون در ارتفاعی بالاتر از پروتئین آلفا گلوکز اکسیدازII در شکل ۳ قراردارد و از نظر عملکرد و میزان بیان در سنین مختلف، کاملاً مشابه پروتئین‌های گلوکز اکسیداز رفتار می‌کند. پروتئین آمیلاز به همراه پروتئین گلوکز اکسیداز ٪۳-۲ از کل پروتئین‌های موجود در غدد شیری زنبورهای عسل جستجوگر را شامل می‌شود و نقش مهمی را در این زنبورها ایفا می‌کند. مطالعه بیان آمیلاز و گلوکز اکسیداز در غدد شیری زنبورعسل کارگر *آپیس ملیفرا* با توجه به تغییر نقش وابسته به سن زنبورعسل کارگر نشان داده است که mRNA آنزیم آمیلاز توسط ایمنوبلاتینگ در غدد شیری زنبورعسل جستجوگر کشف شد، درحالی‌که غدد شیری زنبورهای پرستار فاقد این فعالیت بودند (۱۶). این نتایج

Archive of SID

www.SID.ir

نشان داد که عملکرد غدد شیری در زنبورهای جستجوگر بسیار تخصصی است و بیان ژن آنزیم‌های متابولیسم کربوهیدرات مانند آمیلاز که برای پردازش شهد به عسل موردنیاز است براساس تغییرات نقش وابسته به سن زنبورعسل کارگر انجام می‌شود.

نتیجه‌گیری کلی:

به‌طورکلی با توجه به نتایج به نظر می‌رسد که در مقایسه الگوهای پروتئین‌های غدد شیری مؤثر در تولید ژله رویال و عسل بین سنین مختلف، حداکثر میزان بیان در پروتئین گلوکز اکسیداز، در سن ۲۰ روزگی مشاهده شد. درحالی‌که کمترین میزان بیان در پروتئین‌های مذکور در پروتئین‌های آمیلاز و گلوکز اکسیداز در سن تولد، ۵ و ۱۰ روزگی و پس‌ازآن در پروتئین آلفا گلوکز اکسیداز در روز تولد مشاهده گردید. همچنین میزان بیان تمامی پروتئین‌های ذکرشده در غدد شیری زنبورعسل به‌جز پروتئین‌های ژله رویال در سن یک‌روزگی (روز تولد) بسیار جزئی و قابل‌چشم‌پوشی می‌باشد. همچنین به نظر می‌رسد که تفاوت‌های زیاد در نرخ بیان پروتئین‌ها در سنین مختلف، یکی از مهم‌ترین عوامل مؤثر در کیفیت و کمیت عسل و ژله رویال در زنبورعسل باشد.

منابع

۱. کاکایی، م.، زبرجدی، ع.ر.، و مصطفایی، ع.، ۱۳۸۸. مقایسه فاصله ژنتیکی و مورفوفیزیولوژیکی برخی از ژنوتیپ‌های کلزا بر اساس نشانگر SDS-PAGE. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، شماره ۲، صفحات ۹۳-۷۹.

۲. وثوقی، غ.، ۱۳۷۴. زنبورعسل، آفات، شکارچیان و بیماری‌های آن. مرکز نشر دانشگاهی تهران.

3. Bollag, A., and Edelstein, M., 1991. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal, Biochem, 72, PP: 248-254.

4. Brouwers, E. V. M., 1983. Activation of the hypopharyngeai glands of honeybees in winter, J. Apic, Res, 22, PP: 137-141.

5. Chanchao, C., Srimawong, P., and Wongsiri, S., 2006. Experession of alpha-glucosidase gene in hypopharengealglands of eastern honeybee worker Apis cerana indica, J. Apic, Sci., 50, PP: 5-12.

6. Gruz-Landim, C., and Costa, R. A. C., 1998. Structure and function of the hypopharyngeal glands of Hymenoptera: a comparative approach. J. Comp. Biol., 3, PP: 151–153.

7. Haydak, M. H., 1957. Changes with age in the appearance of some internal organs of the honeybee, Bee World, 38, PP: 197-207.

8. Huber, R.E., and Mathison, R.D., 1976. Physical, chemical and enzymatic studies on the major sucrase of honey bees (Apis mellifera), Canadian Journal of Biochemistry, 54, PP: 153–164.

9. Huang, Z. Y., and Otis, G. W., 1989. Factors determining hypopharengeal gland activity of worker honey bees (Apis mellifera). Insectes Socimz, Paris, PP: 264-276.

10. Kubo, T., Sasaki, M., Nakamura, J., Sasagawa, H., Ohashi, K., Takeuchi, H., and Natori, S., 1996. Change in the expression of hypopharyngeal gland proteins of the worker honeybees (Apis mellifera L.) with age and/or role. Journal of Biochemistry, 119, PP: 291 – 295.

11. Kupke, J., Spaethe, J., Mueller, M. J., Rössler, W., and Albert S., 2012. Molecular and biochemical characterization of the major royal jelly protein in bumblebees suggest a non-nutritive function. Insect Biochem, Mol. Biol., 42, PP: 647–654.

12. Li, M., Feng, Z., Zhang and Pan, Y., 2008. Identification of the proteome complement of hypopharyngeal glands from two strains of honeybees (Apis mellifera), Apidologie, 39, PP: 199–214.

13. Michener, C. D., 1974. The Social Behavior of the Bea: a Comparative Study. Cambridge, MA. Harvard Univ, Press, 404 p.

14. Ohashi, K., Natori, S., and Kubo, T., 1997. Change in the mode of gene expression of the hypopharyngeal gland cells with an age-dependent role change of the worker honeybee

Archive of SID

www.SID.ir

Apis mellifera L. Eur. J. Biochem., 249, PP: 797–802.

15. Ohashi, K., Sasaki, M., Sasagawa, H., Nakamura, J., Natori, S., and Kubo, T., 2000. Functional flexibility of the honey bee hypopharyngeal gland in a dequeened colony, Zoological Science, 17, PP: 1089–1094.

16. Ohashi, K., Natori, S., and Kubo, T., 2001. Expression of amylase and glucose oxidase in the hypopharyngeal gland with an age-dependent role change of the worker honeybee (Apis mellifera L), European Journal of Biochemistry, 265, PP: 127–133.

17. Pavokovi, D., Krinik, B., Amvam Zollo, P. H., and Mothur, S. B., 2012. Evaluation of Protein Extraction Methods for Proteomic Analysis of Non-Model Recalcitrant Plant Tissues, Croatica Chemica Acta., 85(2), PP: 177-183.

18. Simpson, J., Riedel, I. B. M., and Wilding, M., 1968. Invertase in the hypopharyngeal glands of the honey bee, J. Apic, Res., 7, PP: 29–36.

19. Snodgrass, R. E., 1956. Anatomy of the honey bee, Cornell Unwersity Press, Ithaca, New York.

20. Suwannapong, G., Seanbualuang, P., and Wongsiri, S., 2007. A histochemical study of the hypopharyngeal glands of the dwarf honey bees Apis andreniformis and Apis florae. J. Apicult. Res., 46, PP: 260–263.

21. Takewaki, S., Chiba, S., Kimura, A., Matsui, H., and Koike, Y., 1980. Purification and properties of α-glucosidase of the honey bee Apis mellifera L. Agric. Biol. Chem., 44(4), PP: 731–740.

Isolation, characterization and evaluation of protein changes in the milk glands of honey bee at different ages using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Siavoshi Y.[1], Bahreini Behzadi M.R.[1] and Behjatian Esfahani M.[2]

[1] Animal Sciences Dept., College of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, I.R. of Iran

[2] Animal Sciences Dept., College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, I.R. of Iran

Abstract

Alpha-glucose oxidase, amylase and glucose oxidase, as part of digestive enzymes are the most important proteins in the milk glands of forager bees and expressed with three other proteins as the main protein for the production of royal jelly in worker bees. According to expression of proteins in different ages, effect on production of honey and royal jelly, the aim of this study was to investigate these changes. The proteins extracted from milk glands with four methods of tris, phosphate, tri-chloro acetic acid and phenol and stained with three methods included Cumasi Brilliant Blue R-250, Brilliant Blue G-50 and Silver nitrate. After determining the best method of extraction and staining, protein concentrations were be equal by Bradford method and their expressions were evaluated at five age period of birth, 5, 10, 15 and 20 days. The results showed that the highest protein expression involved in royal jelly of milk glands, corresponding to 10 days of age and the lowest protein expression was in 20 days. The highest expression level of proteins involved in honey production was in glucose oxidase, at 20 days and the lowest expression in amylase protein and glucose oxidase at the ages of birth, 5 and 10 days. Most of the major royal jelly protein expression was related to the ages of 5 and 10 days. The results show that there were large differences in the expression of these proteins in different ages that can affect the quality and quantity of honey and royal jelly.

Key words: Electrophoresis, Honey bee, milk glands

Archive of SID

www.SID.ir