刘苗苗,王兆宇,陈龙龙,等.蜂毒PLA2原核表达及溶血作用研究[J].山西农业大学学报(自然科学版),2024,44(2):63-70.
Liu M M, Wang Z Y, Chen L L, et al.Bee venom PLA2 Prokaryotic expression and hemolytic activity study[J].Journal of Shanxi Agricultural University(Natural Science Edition), 2024,44(2):63-70.
doi: 10.13842/j.cnki.issn1671-8151.202309034

蜂毒PLA2原核表达及溶血作用研究

刘苗苗[1],王兆宇[2],陈龙龙[1],吕建华[1],赵慧婷[1*]

(1.山西农业大学 生命科学学院,山西 晋中 030800;2.中国中医科学院 中药研究所,北京,100700)

摘　要:[目的]蜂毒(Bee_Venom, BV)是天然的动物药,药理效应广泛,成分较为复杂。磷脂酶A2(phospholipase A2,PLA2)是蜂毒的重要活性成分和主要过敏原,可与蜂毒肽发挥协同作用,诱发溶血。本研究旨在通过原核系统表达并纯化出蜂毒磷脂酶A2(BvPLA2)蛋白,并通过溶血试验对比蜂毒(bee venom,BV)、蜂毒肽(melittin)以及BvPLA2的溶血效果。[方法]将已构建好的pET28a—*BvPLA2*融合表达载体转化到大肠杆菌BL21菌株中并通过IPTG低温诱导蛋白表达,对表达产物进行鉴定并纯化获得重组BvPLA2蛋白。采集小鼠眼球全血与生理盐水等体积混合配制成2%的红细胞混悬液,加入不同浓度的BvPLA2蛋白液、蜂毒液及蜂毒肽,通过酶标仪测定溶血率。[结果]经IPTG诱导后的表达产物在约15 kDa的分子量处呈现清晰的条带,与理论推算值一致。超声破碎后在上清及沉淀中均表达出特异性条带,且上清中的表达量与沉淀表达量基本一致。不同浓度的BvPLA2蛋白液均具有溶血效果,溶血率均超过5%,且低浓度BvPLA2溶血率较高。经对比得出,BvPLA2溶血率显著低于蜂毒和蜂毒肽($P<0.05$)。[结论]通过原核表达系统成功诱导并纯化出可溶性目标蛋白BvPLA2,且BvPLA2具有一定的溶血效果,但溶血效果显著低于蜂毒和蜂毒肽。

关键词:蜂毒; 磷脂酶A2; 原核表达; 溶血性
中图分类号:Q965.9　　**文献标识码:**A　　**文章编号:**1671-8151(2024)02-0063-08

蜂毒(Bee_Venom,BV)是一种宝贵的中药资源,是中医蜂疗中必不可少的组成部分,具有较高的应用价值。它是一种味苦、酸性、含有清香气味的液体,颜色微黄近乎透明,由工蜂毒腺和副毒腺分泌而出,贮存在蜜蜂毒囊里,在蜜蜂抵御天敌时由尾刺排出[1]。BV化学成分丰富,主要含蜂毒肽(melittin)、蜂毒明肽(apamin)等多种活性肽及磷脂酶A2(phospholipase A2,PLA2)、透明质酸酶(hyaluronidase,Hya)等多种酶类物质[2]。BV作为一种用途广泛的天然药物,药理特性多样,包括抗关节炎,抗凝血,溶血,放射防护,抗病毒,抗癌,抗伤害性,抗菌等,可有效治疗支气管哮喘、高血压、神经系统疾病、血液循环系统疾病和一些免疫相关缺陷等多种病症[3-4]。

BV成分复杂,早前关于粗BV的研究居多。近年来,随着对BV研究和开发的逐步深入,国内外已对其主要有效成分的分子结构、生物活性及作用机理开展了大量研究,因此BV有效活性成分的分离纯化、作用机制及其应用价值逐渐成为研究热点。其中,PLA2便是重要的研究对象之一。蜂毒磷脂酶A2(BvPLA2)是BV中的重要活性组分和主要过敏原之一,约占BV干重的10%~12%,分子量约为15~18 kDa[5]。根据其来源及生化特性,BvPLA2属于胞外分泌型PLA2碱性糖蛋白,为单一多肽链,共含134个氨基酸残基,N-聚糖链共价结合于其肽链的第13位点天冬酰氨上[6-7]。作为水解天然磷脂的催化酶,BvPLA2可催化甘油磷脂分子的第2位酯酰键水解,释放脂肪酸及溶血磷脂,二者皆是对双分子膜结构有影响的高强度膜活性因子,在膜区域非常活跃,会导致

收稿日期:2023-09-29　　**修回日期:**2023-11-20
基金项目:山西省自然科学青年基金项目(201901D211356)
作者简介:刘苗苗(ORCID:0009-0005-5067-768X),硕士研究生,研究方向:蜂毒毒理学
*通信作者:赵慧婷(ORCID:0000-0001-7227-0374),副教授,硕士生导师,E-mail:zhaohting@126.com

红细胞溶解。当细胞膜裂解后,其它BV成分就可以进入膜内发挥作用,主要是与Melittin起协同效应,引起强溶血反应,故称BvPLA2为“间接的溶血毒素”[8],BvPLA2是目前已知具有很高应用价值的生物活性较强的一类PLA2酶。沈立荣等[9-10]在成功克隆意大利蜜蜂和中华蜜蜂的PLA2序列后,在大肠杆菌中表达*AmPLA2*基因,并制作多克隆抗体进行Western blot分析,结果表明其活性与天然纯AmPLA2相同。另以抗天然纯AmPLA2的特异性抗血清为第一抗体,利用杆状病毒昆虫细胞系统表达出*AmPLA2*基因,Western blot印迹显示其融合表达产物可与AmPLA2抗血清产生免疫反应,表现出很高的免疫活性[11]。

在溶血方面,BV中起主要作用的为Melittin,由于其具有溶血性,故又称溶血肽。目前关于Melittin溶血作用的研究居多,并且已有研究证明在红细胞裂解过程中,BvPLA2和Melittin之间存在协同作用[2,12]。但关于BvPLA2单一成分溶血作用方面的研究还未见报道,且BvPLA2作为BV的主要过敏原,其安全性仍是临床治疗过程中的一个强有力的限制性考虑因素。因此,本研究通过大肠杆菌BL21原核表达系统表达并纯化Bv-PLA2来进一步探究其溶血作用,旨在为BV有效成分的毒理学研究及安全性评价奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料及动物

pET28a载体由山西农业大学生命科学学院实验室提供[13](载体图谱如图1);pET28a-B*vPLA2*重组表达质粒由生工生物工程(上海)有限公司构建;蜂毒冻干粉由安徽金蜂蜂毒生物科技开发有限公司;蜂毒肽冻干粉购自南京源肽生物科技有限公司提供;大肠杆菌BL21感受态细胞购自全式金生物(北京)有限公司。

SPF级昆明雄性健康小鼠,购自北京斯贝福生物技术有限公司,生产许可证号:SCXK(京)2019-0010,饲养温度为18~25 ℃,相对湿度为50%~70%,自然光照,专用饲料,自由饮水,适应性饲养1周。

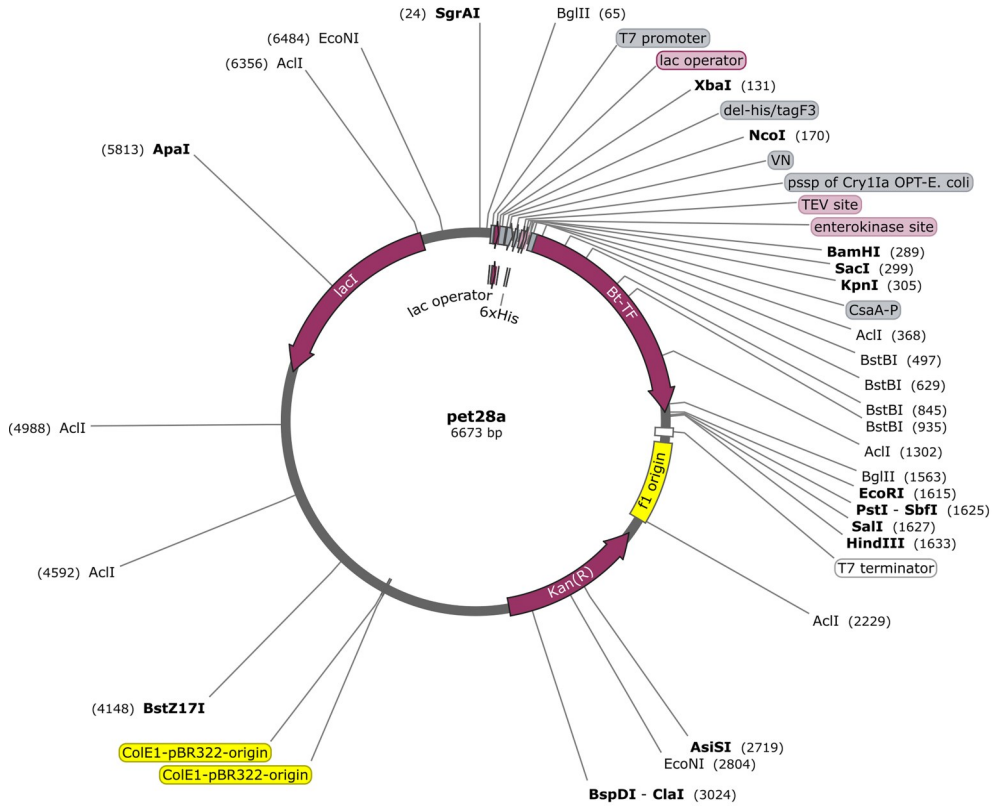


图1 pET28a载体图谱

Fig.1 pET28a carrier map

1.2　试验方法

1.2.1　意大利蜜蜂PLA2原核表达

1.2.1.1　重组表达质粒的转化

－80 ℃冰箱中取出BL21感受态细胞放入冰盒中消融10 min,吸取50 μL于1.5 mL EP管内;

EP管内加入1 μL的连接产物(pET28a-*BvPLA2*重组表达质粒),轻悬EP管,冰上孵育30 min;

42 ℃水浴热激90 s,立即移入冰上静置3 min,此过程中禁止晃动EP管;

将800 μL LB培养液加入管内,37 ℃、200 r·min^{-1}摇床中培养1 h;

将EP管在4000 r·min^{-1}下进行3 min 30 s的离心,去上清,留100 μL菌液重悬,将其涂在含卡那霉素的平板上,37 ℃倒置培养10～12 h后得到含重组表达质粒的表达宿主菌种。

1.2.1.2　诱导表达

挑单菌落接种至内有3 mL培养液(内有3 μL 50 mg·mL^{-1}的卡那霉素)的15 mL离心管,于37 ℃、200 r·min^{-1}下振摇培养6 h,吸100 μL小摇菌液至含卡那霉素的100 mL培养液内,然后于37 ℃、200 r·min^{-1}下进行10～12 h的培养;

OD600到0.8时,在锥形瓶内加100 μL的IPTG诱导剂(1 mol·L^{-1}),于28 ℃、200 r·min^{-1}下振摇培养6 h;

诱导前后需要保菌,制蛋白样品;

将锥形瓶溶液分别装至2个50 mL离心管,于4 ℃、8000 g进行10 min的离心,弃上清;

加3 mL PBS重悬沉淀,并将两管沉淀合为1管,将PBS补充至30 mL;

超声破碎1 h左右,功率300 W,超声破碎3 s,间歇3 s,冰上进行;

结束后,于4 ℃、12 000 r·min^{-1}下进行15 min的离心,留上清和沉淀并制蛋白样;

对诱导前后,超声破碎上清及沉淀的蛋白样进行电泳试验。电泳前把样品放入100 ℃的水浴锅内加热10 min,加热结束后于10 000 r·min^{-1}离心3或5 min。

1.2.1.3　SDS-PAGE凝胶电泳

清洗并烘干玻璃面板后安好制胶模;

将制好的12%分离胶倒入胶板中,后在上层添加无水乙醇,使凝胶表面趋于平坦,在室温下凝结1 h左右;

等分离胶固态化,倒出上层液体并用滤纸吸收剩余液体;

添加制作出的5%浓缩胶,在适当位置将梳子插入,尽量防止出现气泡,于常温下等待30 min左右便可凝固;

等浓缩胶固态化,慢慢抽去梳子。将胶板装入电泳槽并浸泡于1×电泳缓冲液内。将蛋白Marker及蛋白样品点入样孔内,合上盖子,接通电源。控制电压在80 V,约30～40 min,换120 V电压,约1 h后结束。

1.2.1.4　染色与脱色

完成电泳后,从2片玻璃板间剥落凝胶,放入盒中并倒入考马斯亮蓝R-250蛋白染液,用沸水煮10 min左右,待染上色后,再加入脱色液洗脱,期间更换脱色液1到2次,每次煮15 min左右,最后将胶放到含有脱色液的摇床上,洗脱至条带明晰并拍照。

1.2.2　BvPLA2蛋白纯化及浓缩

1.2.2.1　层析柱的准备

添加Ni-Agarose Resin填充物至层析柱中,静放10 min,当填充物和溶液出现层化,开启底部出液口,使乙醇在重力影响下慢慢滴下;

将5个柱体积的去离子水加到柱上冲净残存乙醇,后加8个柱体积的平衡缓冲液使层析柱保持平衡。

1.2.2.2　蛋白的纯化

向层析柱中加入超声破碎后上清液,按照每小时10个柱体积的流量,采集流过液;

向层析柱中加入15个填料体积的10 m·moL^{-1}咪唑洗柱,洗掉挂在柱上的杂蛋白;

按50、100、200、250、300、500 m·moL^{-1}的顺序加咪唑液去洗掉挂柱目的蛋白,收集洗脱峰;

d洗脱结束,按顺序用5倍填料体积的10 m·moL^{-1}咪唑、5倍填料体积的LE缓冲液、5倍填料体积的去离子水冲洗层析柱,然后用3倍填料体积的20%乙醇(乙醇要浸透填料)对层析柱进行平衡,封柱后储存于2～8 ℃;

纯化后进行蛋白制样,并进行电泳跑胶。

1.2.2.3　蛋白浓缩

将超滤管中的NaOH倒掉,用蒸馏水洗涤2到3次并倒掉,将蛋白液倒入超滤管,4 ℃、4000 g,离

心20～40 min。

1.2.3 蛋白浓度测定

牛血清蛋白标品,用天平称取0.006 g的BSA,溶于50 mL的蒸馏水中,溶液浓度为120 μg·mL^{-1},用移液枪依次取0、24、48、72、96、120 μL的BSA溶液到不同的1.5 mL EP管中,再分别加入120、96、72、48、24、0 μL的蒸馏水,将其混合均匀,获得1组为0、24、48、72、96、120 μg·mL^{-1}浓度的BSA。最后加入600 μL的考马斯亮蓝G-250到各管中配成720 μL的溶液;

将120 μL BvPLA2液加到EP管中,再将600 μL的考马斯亮蓝G-250加到管内;

将每个样品分别加入3个重复的酶标孔中,每个酶标孔加200 μL的样品。静放2 min后,利用酶标仪检测溶液的吸光度。

1.2.4 溶血试验

1.2.4.1 红细胞混悬液的制备

将100 μL抗凝剂EDTA·2K添入EP管内,取雄小鼠6只,每只均采集眼球全血约1 mL加入抗凝剂中,用灭过菌的牙签将纤维蛋白去除,使之成为脱纤血液;

将EP管于1000 r·min^{-1}离心3 min,吸净上层血浆;

然后向管中添加1 mL生理盐水使其混匀后并进行洗涤,于1000 r·min^{-1}下离心3 min,舍去上清,可去除表面的白细胞,重复上述操作3～4次,待上清呈现无色透明时停止操作。最后一次操作结束时,弃上清并吸200 μL的压积红细胞到10 mL的生理盐水内。

1.2.4.2 测定溶血率

蒸馏水添加红细胞混悬液为阳性对照,生理盐水与其混合为阴性对照。根据纯化后测定的BvPLA2浓度计算出作为对比的BV及Melittin的浓度,BvPLA2蛋白液为2种浓度,0.46 mg·mL^{-1}及0.23 mg·mL^{-1}。BV浓度为3.8 mg·mL^{-1}及1.9 mg·mL^{-1},Melittin浓度为2.0 mg·mL^{-1}及1.0 mg·mL^{-1},然后各取0.5 mL与0.5 mL的红细胞混悬液进行混合。轻轻摇动使其均匀后,将溶液放入37 ℃水浴中保温孵育,在孵育后的15、30、45 min和1、2及3 h,进行肉眼观察并评价其溶血性。3 h后在10 000 r·min^{-1}进行3 min的离心,然后分别吸200 μL上清到酶标孔中,用545 nm的波长检测吸光度(A)。每个样品做3次技术重复。

溶血率=($A_{样品}-A_{阴性}$)/($A_{阳性}-A_{阴性}$)×100%。数值超过5%即可视为溶血。

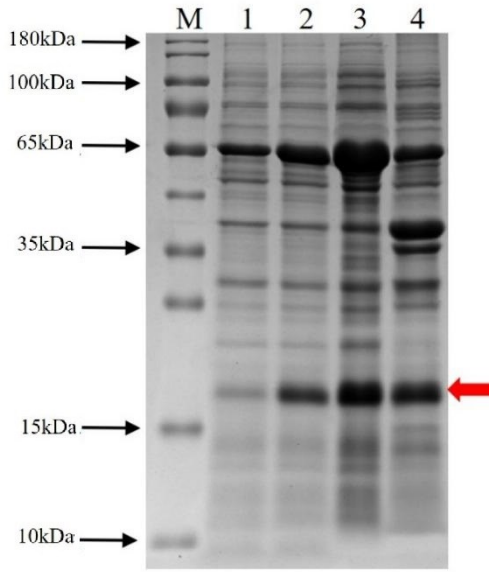
1.3 数据分析

利用Excel 2016对数据进行记录及整理。计量资料数据采用均数±标准误($\bar{x}\pm SE$)表示。利用SPSS 26.0对不同处理组间溶血率的比较进行单因素方差分析,多重比较用Duncan氏法,以$P<0.05$记为组间有显著差异。

2 结果分析

2.1 BvPLA2重组蛋白SDS-PAGE结果分析

SDS-PAGE结果显示,IPTG诱导后的表达产物在约为15 kDa的分子量下具有清晰的特异性表达条带(图2),与理论推算值14.7 kDa基本一致。超声破碎后在上清及沉淀中均表达出特异性表达条带,且上清的表达量与沉淀表达量基本一致(图2),表明BvPLA2诱导成功。



M为蛋白Marker,1为诱导前,2为诱导后,3为破碎后上清,4为破碎后沉淀,红色箭头指向目的蛋白

M is protein Marker, 1 is before induction, 2 is after induction, 3 is the supernatant after fragmentation, 4 is the precipitate after fragmentation, and the red arrow points to the target protein

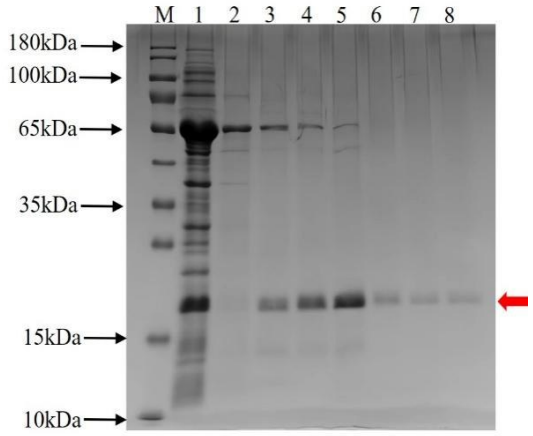
图2 BvPLA2诱导前后及破碎后上清与沉淀的SDS-PAGE分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of supernatant and precipitate before and after BvPLA2 induction and after disruption

2.2 BvPLA2纯化后SDS-PAGE结果分析

超声破碎后取上清液进行纯化,从SDS-PAGE图谱看出,目的蛋白用亲和层析法成功纯

化,且在200 m·moL^{-1}咪唑中洗脱的重组BvPLA2表达量较其它浓度多(图3)。



M为蛋白Marker,1为AmPLA2流穿液,2为10 mmol^{-1}咪唑蛋白液,3为50 mmol^{-1}咪唑蛋白液,4为100 mmol^{-1}咪唑蛋白液,5为200 mmol^{-1}咪唑蛋白液,6为250 mmol^{-1}咪唑蛋白液,7为300 mmol^{-1}咪唑蛋白液,8为500 mmol^{-1}咪唑蛋白液,红色箭头指向目的蛋白

M is protein Marker, 1 is AmPLA2 flow through fluid, 2 is 10 mmol^{-1} imidazole protein solution, 3 is 50 mmol^{-1} imidazole protein solution, 4 is 100 mmol^{-1} imidazole protein solution, 5 is 200 mmol^{-1} imidazole protein solution, 6 is 250 mmol^{-1} imidazole protein solution, 7 is 300 mmol^{-1} imidazole protein solution, 8 is 500 mmmol^{-1} imidazole protein solution, the red arrow points to the target protein

图3　BvPLA2纯化后SDS-PAGE分析

Fig.3　SDS-PAGE analysis of BvPLA2 after purification

2.3　蛋白浓度测定结果

BSA法对纯化后BvPLA2目的蛋白溶液进行浓度测定,建立标准曲线如下(图4),得到标准曲线方程$y=0.002\,4x+1.091\,2$($R^2=0.993\,3$),该标准曲线方程计算得到吸光度值为2.199的BvPLA2蛋白液浓度约为462 μg·mL^{-1},即0.46 mg·mL^{-1}。

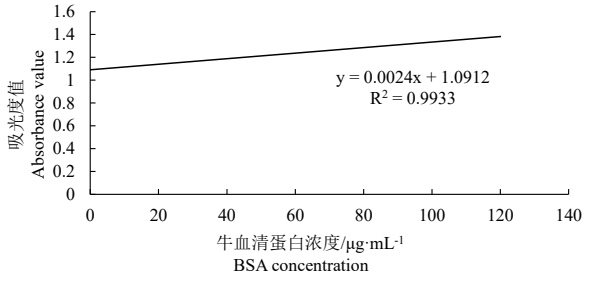


图4　蛋白浓度测定标准曲线

Fig.4　Standard curve for protein concentration determination

2.4　体外溶血现象观察及溶血率分析

在体外溶血试验中,不同BvPLA2、Melittin、BV溶液与红细胞混悬液的混合液孵育45 min后进行观察。肉眼观察到生理盐水组开始出现分层,底部有红细胞凝聚,上层溶液未变红,说明生理盐水无溶血作用。BvPLA2组不同浓度皆有少量红细胞凝聚现象,且未出现分层,较生理盐水组溶液颜色偏红,说明BvPLA2有溶血作用但溶血性不强。BV组、Melittin组及蒸馏水组难以观察到有红细胞凝聚,且不同组间颜色有差别,Melittin组颜色较BV组更接近阳性对照蒸馏水组,表明其溶血性更强。随时间推移,BvPLA2组,BV组,Melittin组溶液颜色都逐渐加深,说明溶液与红细胞作用时间越长,溶血越严重。

试验组和对照组的混合液在孵育3 h后结束观察,取出后用酶标仪分别测出不同溶液在545 nm下的吸光度值,用公式算出每组的溶血率。从溶血率结果可以看出(表1),不同浓度的BvPLA2组、BV组、Melittin组均有溶血作用,且溶血率均>5%;BvPLA2高剂量组溶血率最低,均显著低于其它样品溶液($P<0.05$);BvPLA2低剂量组溶血率与BV高剂量组组差异不显著($P>0.05$);Melittin低剂量组溶血率均显著高于其它样品组($P<0.05$);BvPLA2组、BV组及Melittin组每组间的溶血率差异均显著($P<0.05$)。BvPLA2组、BV组及Melittin组的溶血率均是低剂量组溶血性较强,且显著高于高剂量组。

表1　体外溶血率测定结果

Table 1　Determination of hemolysis rate in vitro

样品 Sample	浓度/(mg·mL^{-1}) Concentration	溶血率/% Hemolysis Rate
BvPLA2低剂量组	0.23	69.80±0.87d
BvPLA2高剂量组	0.46	16.20±0.41e
Melittin低剂量组	1.00	111.94±1.40a
Melittin高剂量组	2.00	103.39±1.38b
BV低剂量组	1.90	89.83±1.29c
BV高剂量组	3.80	68.35±1.87d

注:不同组间标有相同字母的表示差异不显著($P>0.05$),无相同字母的表示差异显著($P<0.05$)

Note: The same letter in the table indicated non-significant difference between different dose groups ($P>0.05$); the different letter indicated significant differences between groups ($P<0.05$)

3　讨论

蜂毒PLA2属于生物活性较强的一种PLA2酶,是意大利蜜蜂毒液的主要成分,由于其潜在的治疗应用而引起了科研人员的极大关注,在生化、细胞、分子生物学、医学、基因工程、农业等方面发

展潜力巨大。从天然的蜜蜂体内提取并纯化PLA2工艺较为复杂,此方法需通过对蜜蜂进行电击获取,不利于生态环境的发展。且提取的成分纯度不高、成本大、耗时长,使得PLA2的广泛应用受到限制。目前,利用基因工程技术在大肠杆菌中获得大量蛋白产物是现代分子生物学的成就之一[14-15]。本试验通过pET28a构建了*BvPLA2*基因的表达重组载体,在大肠杆菌BL21菌株中通过IPTG进行低温诱导,BvPLA2蛋白表达的SDS-PAGE结果表明,诱导后的表达产物在约为15 kDa的分子量下具有清晰的特异性表达条带,本结果与沈立荣等[10]研究结果相符,说明BvPLA2蛋白表达成功。超声破碎蛋白后,在SDS-PAGE图谱中观察到上清及沉淀中均表达出特异性条带,且上清的表达量与沉淀表达量基本一致,这与沈立荣描述的表达产物通常以包涵体形式的存在略有不同,推测可能是由于所选择的载体pET28a存在促溶标签,进而提高了可溶性蛋白的表达量。此外,适宜的诱导温度与时间也是提高蛋白表达量的原因之一。本试验中可溶性蛋白与包涵体蛋白的表达量几乎相近,后续可以根据大肠杆菌密码子偏好性、基因GC含量等方式对*BvPLA2*基因序列进行改造,进一步提高其可溶性蛋白的表达含量[16-17]。本试验选择对破碎后的蛋白上清液进行了纯化,根据SDS-PAGE结果选择重组BvPLA2的表达量较多且杂蛋白较少的蛋白液进行纯化。本试验通过原核表达相关蛋白,可以为今后批量生产BvPLA2向着更便捷和程序化的方式进行。

BV的溶血性主要是由Melittin和PLA2起作用。Melittin会使膜表面产生裂隙和破孔,可以直接使红细胞膜破裂,并发现Melittin会造成膜结构的损坏并对膜上的相关蛋白或酶类物质产生影响,进而会对有关联的代谢途径产生影响,产生溶血性。而PLA2可以水解磷脂脂肪链,使卵磷脂能分解为可作用于细胞膜的溶血卵磷脂,可以破坏红血球,致使红细胞溶解,然而,PLA2不直接作用于细胞壁脂类,它需要依赖Melittin,或者与底物复合之后依靠底物靠近细胞使之溶解,因此PLA2具有间接的溶血作用[18-20]。通常BV在溶血方面的研究主要以Melittin为主,BvPLA2在其中总是扮演辅助角色。石伟等[18]研究证实,Melittin对小鼠红细胞表现出较高的溶血活性,且在0.8~4 μmol·L^{-1}范围内呈剂量依赖性,但本研究中低剂量Melittin溶血率显著大于高剂量Melittin。此外,试验通过对比高低剂量组BV溶血作用,发现低浓度BV溶血率较高,这与本课题组前期试验结果一致,即BV在一定浓度范围内(0.1~10 mg·mL^{-1}),其溶血率呈反剂量依赖性(结果未发表)。BV及其主成分具体溶血机制还有待进一步研究。目前关于BvPLA2单一成分溶血方面的研究较少,本试验利用体外观察法和酶标仪对BvPLA2溶血性进行检测,同时将AmPLA2与BV、Melittin的溶血性进行了比较。结果证实,BvPLA2具有溶血效果,且低浓度溶血活性较强,另外,BvPLA2溶血率显著低于BV及Melittin,表明BvPLA2单一成分的溶血效果较低。

近年来BV及其有效成分被认为是治疗许多疾病的合成药物的首选药,但由于个体免疫系统和剂量问题,BV及其有效成分的应用有时会引起过敏反应,使用不当还可能会对机体造成溶血性贫血[3-4]。BvPLA2与Melittin诸多药理作用相似,但因Melittin的强溶血活性使其在临床应用中受到了很大的局限性[21]。本试验研究表明BvPLA2溶血活性显著低于Melittin,这一结果提示也许在临床应用中BvPLA2可以替代因浓度问题造成严重溶血性的Melittin。但BvPLA2作为BV主要过敏原,在使用方面也需多加注意,这些问题都值得后续深入探讨。

4 结论

本研究利用大肠杆菌系统成功表达并纯化出BvPLA2,目标蛋白约15 kDa,与预期蛋白表达分子量基本一致。目的蛋白破碎后在上清和沉淀中均表达,在200 m·mol^{-1}咪唑中洗脱的重组BvPLA2的表达量较多且杂蛋白较少。利用酶标仪测定数据计算溶血率,并与BV及Melittin溶血效果进行比较,得出BvPLA2溶血作用低于BV及Melittin,且浓度越低,溶血效果越强。

BvPLA2药理作用广泛,但因其为BV主要过敏原,临床治疗中的安全性评价便更为重要。本研究结果为BV单一有效成分的毒理学研究及安全性评价提供了理论依据,具有一定的实际意义。

参 考 文 献

[1]彭德粥,张真,马振刚.综述蜂毒的应用[J].蜜蜂杂志,2021,41(12):1-4.
Peng D Z, Zhang Z, Ma Z G. Review on the application of bee venom [J].Journal of Bee,2021,41(12):1-4.

[2]张冰清,刘晓波.蜂毒的主要成分及药理作用的研究进展[J].药学研究,2016,35(03):172-174.
Zhang B Q, Liu X B. Advances in main compositions and pharmacological effects of bee venom [J]. Journal of Pharmaceutical Research,2016,35(03):172-174.

[3]Ullah A, Aldakheel F M, Anjum S I, et al. Pharmacological properties and therapeutic potential of honey bee venom [J]. Saudi Pharmaceutical Journal,2023,31(1):96-109.

[4]刘红云,童富淡.蜂毒的研究进展及其临床应用[J].中药材,2003,(06):456-458.
Liu H Y, Tong F D. Research progress and clinical application of bee venom [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2003,(06):456-458.

[5]Carpena M, NuñezEstevez B, SoriaLopez A, et al. Bee Venom: An updating review of its bioactive molecules and its health applications[J]. Nutrients,2020,12(11):3360.

[6]高丽娇,吴杰.蜜蜂蜂毒主要成分与功能研究进展[J].基因组学与应用生物学,2013,32(02):246-253.
Gao L J, Wu J. Advance on the main compositions and the functions of honeybee venom [J]. Genomics and Applied Biology,2013,32(02):246-253.

[7]陈会良,贺绍君.蜂毒化学成分及其作用机理研究进展[J].安徽农业科学,2014,42(05):1406-1408.
Chen H L, He S J. Research advance on the chemical composition and action mechanism of honeybee venom [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2014, 42(05): 1406-1408.

[8]Dania J, Jean-Marc S, Lara B, et al. Bee Venom PLA2 versus Snake Venom PLA2: evaluation of structural and functional properties[J]. Venoms and Toxins, 2022, 2(1):17-28.

[9]沈立荣,张传溪,程家安.中华蜜蜂和意大利蜜蜂蜂毒磷脂酶A2基因的克隆与序列分析[J].农业生物技术学报,2002,(01):29-32,34-35.
Shen L R, Zhang C X, Cheng J A. Cloning and sequencing of genes encoding phospholipase A2 from the Venom of *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera* [J]. Journal of Agricultural Biotechnology,2002,(01):29-32,34-35.

[10]沈立荣,程家安,张传溪,等.意大利蜜蜂蜂毒磷脂酶A2基因在大肠杆菌中的表达[J].浙江大学学报(农业与生命科学版),2004,(01)92-95.
Shen L R, Cheng J A, Zhang C X, et al. Expression of a bee-venom phospholipase A2 gene from *Apis mellifera* in *Escherichia coli* [J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences),2004,(01):92-95.

[11]沈立荣,邢丽苹,张传溪,等.意大利蜜蜂蜂毒磷脂酶A2基因在杆状病毒-昆虫细胞系统中的表达[J].昆虫学报,2006,(03):367-372.
Shen L R, Xing L P, Zhang C X, et al. Expression of phospholipase A2 gene from the venom of *Apis mellifera* in the baculovirus-inset cell system [J]. Acta Entomologica Sinica, 2006,(03):367-372.

[12]Rim W, Jacinthe F, Mohamad R, et al. Bee Venom: overview of main compounds and bioactivities for therapeutic interests[J]. Molecules,2019,24(16):2997.

[13]Gao J, Ouyang C, Zhao J, et al. Coexpressing the signal peptide of Vip3A and the trigger factor of *Bacillus thuringiensis* enhances the production yield and solubility of eGFP in *Escherichia coli* [J]. Frontiers in Microbiology. 2022, 13: 892428.

[14]高丽娇.小峰熊蜂蜂毒磷脂酶A2基因(PLA2)的克隆及表达分析[D].北京:中国农业科学院,2013.
Gao L J. Cloning and expression of phospholipase A2 (*PLA2*) gene from the Venom of *Bombus hypocrita* (Hymenoptera: Apidae) [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2013.

[15]陈江,王炜煜,卢志贤,等.绿色荧光蛋白标记蜂毒肽的表达及其抗肝癌效应的初步评价[J].中华肝脏病杂志,2006(11):847-849.
Chen J, Wang W Y, Lu Z Xet, al. Expression of melittin tagged with green fluorescent protein and its usein hepatocellular carcinoma treatment [J]. Chinese Journal of Hepatology,2006,14(11):847-849.

[16]郭新军.蜂毒前溶血肽原基因的改造及其原核表达[J].江苏农业科学,2020,48(16):87-90.
Guo X J. Modification of prepromelittin gene and its expression in prokaryotic cells[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2020,48 (16):87-90.

[17]王文佳,田维毅,蔡琨,等.蜂毒肽基因原核表达载体的构建及重组蛋白生物活性作用的研究[J].天然产物研究与开发,2020,32(12):2115-2121.
Wang W J, Tian W Y, Cai Ket, al. Study on construction of prokaryotic expression vector of melittin gene and bioactivity of recombinant protein [J]. Natural Product Research and Development,2020,32(12):2115-2121.

[18]石伟,李彩云,陈玉清.蜂毒肽Melittin对小鼠红细胞溶血效应及影响机制分析[J].南京师大学报(自然科学版),2015,38(02):86-92.
Shi W, Li C Y, Chen Y Q. The effect of melittin on rat red blood cells and its mechanism[J]. Journal of Nanjing Normal University(Natural Science Edition), 2015,38(02):86-92.

[19]李英华,胡福良,刘艳荷.蜂毒过敏原磷脂酶A2[J].生命的化学,2001,(04):299-302.
Li Y H, Hu F L, Liu Y H. Bee venom allergen phospholipase A2[J]. Chemistry of Life,2001,(04):299-302.

[20]施婉君.2种蜜蜂和4种胡蜂溶血肽基因克隆与表达研究[D].浙江:浙江大学,2003.

Shi W J. Cloning and expression of melittin genes from 2 honeybee species and avespoidea species [D]. Zhejiang: Zhejiang University, 2003.

[21]王康莉, 李珊珊, 胡福良. 2021年国内外蜂毒研究概况[J]. 蜜蜂杂志, 2022,42(10):1-8.

Wang K L, Li S S, Hu F L. Research status of Bee Venom in 2021[J]. Journal of Bee,2022,42(10):1-8.

Bee venom PLA2 Prokaryotic expression and hemolytic activity study

Liu Miaomiao[1], Wang Zhaoyu[2], Chen Longlong[1], Lü Jianhua[1], Zhao Huiting[1*]

(*1.College of Life Sciences, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030800, China; 2.Institute of Chinese Materia Medica China Academy Of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China*)

Abstract: [Objective] Bee venom is a natural animal medicine with broad pharmacological effects and complex composition. Phospholipase A2(PLA2) is an important active ingredient and major allergen of bee venom, which can synergize with melittin to induce hemolysis. This study aimed to express and purify BvPLA2 protein in prokaryotic system and compare the hemolytic effects of bee venom (BV), melittin, and BvPLA2 through hemolysis tests. [Method] The constructed pET28a-*BvPLA2* fusion expression vector was transformed into *E. coli* BL21 strain, and the protein expression was induced by IPTG at low temperature. The expression product was identified and purified to obtain the recombinant BvPLA2 protein. Whole blood from mice was collected and mixed with physiological saline to prepare a 2% red blood cell suspension, and different concentrations of BvPLA2 protein solution, bee venom, and melittin were added. The hemolysis rate was determined by enzyme-linked immunosorbent assay. [Results] The expression product induced by IPTG showed a clear band at approximately 15 kDa, consistent with the theoretical calculation value. Specific bands were expressed in both the supernatant and sediment after ultrasonication, and the expression levels in the supernatant were basically consistent with those in the sediment. BvPLA2 protein solutions at different concentrations exhibited hemolytic effects, with hemolytic rates exceeding 5%, and the hemolysis rate was higher at low concentration of BvPLA2. By comparison, the hemolysis rate of BvPLA2 was significantly lower than that of bee venom and melittin($P<0.05$). [Conclusion] Soluble target protein BvPLA2 was successfully induced and purified through the prokaryotic expression system, and BvPLA2 exhibited certain hemolytic effects, but the hemolytic effect was significantly lower than that of bee venom and melittin.

Keywords: Bee venom, Phospholipase A2, Prokaryotic expression, Hemolysis

(编辑:吕俊俐)