

触形大疣蛛毒素多肽的分离和鉴定

唐兴¹, 陈连水¹, 黄亚洲², 段志贵², 刘中华², 梁宋平²

(1. 东华理工大学江西省质谱科学与仪器重点实验室, 南昌 330013;

2. 湖南师范大学动物多肽药物国家地方联合工程实验室, 长沙 410081)

摘要: 蜘蛛是种类最多的有毒动物, 其毒液主要成分是富含二硫键的毒素多肽。蜘蛛毒素多肽主要功能是作用于昆虫神经系统的离子通道或受体。触形大疣蛛隶属于蜘蛛目, 原蛛下目, 异纺蛛科。通过反相高效液相色谱分离触形大疣蛛粗毒, 再通过 MALDI-TOF-TOF 质谱对各个洗脱峰进行分子量测定。实验结果显示, 从触形大疣蛛粗毒中一共鉴定到 108 种的毒素多肽, 其分子量在 2 000~7 500 Da 均有分布, 主要分子量范围分布在 2 000~4 500 Da (占 63.9%), 还有一部分分布在 4 500~6 000 Da, 而在 6 000~7 500 Da 范围内分布很少。其分子量的分布特征与已报道的原蛛下目蜘蛛均不同, 反映了这种蜘蛛毒液成分具有独特的多样性。

关键词: 蜘蛛毒素多肽; 触形大疣蛛; 反相高效液相色谱; 质谱; 多样性

中图分类号: Q51

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2017)05-0839-05

Isolation and identification of toxin peptides from *Macrothele palpator* crude venom

TANG Xing¹, CHEN Lianshui¹, HUANG Yazhou², DUAN Zhigui², LIU Zhonghua², LIANG Songping²

(1. Jiangxi Key Laboratory for Mass Spectrometry and Instrumentation, East China University of Technology, Nanchang 330013;

2. The National & Local Joint Engineering Laboratory of Animal Peptide Drug Development, Hunan Normal University, Changsha 410081)

Abstract: Spiders are a large group of venomous animals. In spider venoms, there are a large number of disulfide bonds- toxin peptides that are effective insecticides targeting a wide range of ion channels or receptors in insect nervous systems. *M. palpator* belongs to the family Hexathelidae (Araneae: Mygalomorphae). In this study, we used reversed-phase high performance liquid chromatography to isolate the crude venom from *Macrothele palpator* crude venom, and then the molecular weight of the eluted fractions was analyzed by MALDI-TOF-TOF mass spectrometry. In this experiment, a total of 108 toxin peptides were detected in a mass range from 2 000 Da to 7 500 Da. The vast majority of these peptides fell in the mass range of 2 000-4 500 Da, accounting for 63.9% the total peptides. There is a part of peptide toxins with molecular weight range of 4 500- 6 000 Da, but peptide toxins in the mass range of 6000-7500 Da were limited. The distribution of molecular weight in venom peptides from *M. palpator* was very different from those of other spiders in mygalomorph, indicating a specific diversity of venom components from this spider species.

Key words: toxin peptide; insecticide; *Macrothele palpator*; reversed-phase high performance liquid chromatography; mass spectrometry; diversity

蜘蛛毒液的化学成分是极其复杂的^[1], 其中主要成分是富含二硫键的神经毒素多肽, 并且这种化合物是有效的杀虫剂^[2]。经过百万年的转化, 蜘蛛毒素多肽对昆虫神经系统离子通道中的作用变得很广泛。这些多肽可以单独或协同作用, 从而对昆虫

起到快速地麻痹和致死作用。很多蜘蛛毒素多肽含有其独特的结构, 以至于能抵抗蛋白酶的消化, 结果使其在昆虫的肠道和淋巴非常稳定^[3]。因此, 蜘蛛毒素多肽可以单独作为生物杀虫剂, 或者通过转基因工程培育出抗害虫的作物^[4-6]。

收稿日期: 2017-03-04

基金项目: 国家自然科学基金(31201718, 31402025), 长江学者和创新团队发展计划项目(IRT13054), 江西省自然科学基金(20114BAB214015, 20142BAB204011), 江西省教育厅青年科学基金(GJJ12389), 东华理工大学博士科研启动基金(DHBK1008)和湖南省生物发育工程及新产品研发协同中心项目(20134486)共同资助。

作者简介: 唐兴, 博士, 讲师。E-mail: xtang2011@sina.com

触形大疣蛛隶属于蛛形纲,蜘蛛目,原蛛下目,异纺蛛科,大疣蛛属。成年雌性触形大疣蛛体长2~3 cm,全身为黑色或棕褐色^[7]。分布于江西、湖南、广东及贵州等地,常见于茶园、土坝和山坡等地点^[8-11]。洞口布有蛛丝,呈喇叭状。这种蜘蛛洞口直径大约1~2cm,深约10 cm甚至以上,常为垂直洞穴。该蜘蛛经常不止一个洞穴,常有多个洞穴相连,构造极其复杂。触形大疣蛛是多种农业害虫的重要天敌,有一定的保护价值。国内对触形大疣蛛的形态分类和生态分布等有过报道,但是对其粗毒及所含毒素成分研究未有报道。本实验首次结合反向高效液相色谱和MALDI-TOF-TOF质谱对触形大疣蛛毒液中的毒素多肽成分进行分离和鉴定。

1 材料与方 法

1.1 触形大疣蛛采集与粗毒的制备

成年雌性触形大疣蛛(图1)采集于江西省林业科学研究所茶园,并人工饲养在实验室。蜘蛛毒液通过改造的电刺激器进行电刺激法采集,刺激电压强度为20 V,频率为中等。

该蜘蛛采集毒液较少,需要收集大量蜘蛛并多次分批采集毒液。收集到一定量的蜘蛛毒液,冷冻干燥后即蜘蛛粗毒。每20只蜘蛛采集的毒液冻干后约1.0 mg。



图1 雌性触形大疣蛛
Figure 1 Female *M. palpator*

1.2 触形大疣蛛粗毒的分离纯化

样品溶液的分离使用Alliance 高效液相色谱仪(Waters公司)和Phenomenex(菲罗门)C18反相柱(250 mm × 4.6 mm)。两相洗脱系统作为流动相:A液:含0.1%TFA(V/V)的双蒸水;B液:含0.1%TFA(V/V)的乙腈。两种溶液都通过加入氦气除去溶液中的气泡,静置。称取触形大疣蛛粗毒1 mg,用0.5 mL双蒸水溶解,12 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清液即为样品溶液。样品溶液通过

进样器进样,并用A液进行脱盐20 min。然后开始用B液进行洗脱,流速为1.0 mL·min⁻¹,监测波长为215 nm,柱温为25 °C,具体梯度设定见表1。根据洗脱时间收集各洗脱峰,并冷冻干燥后保存。

表1 反相高效液相色谱洗脱梯度

Table 1 Gradient elution in reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC)

时间/min Time	流速/mL·min ⁻¹ Flow rate	A/%	B/%
0	1.0	95	5
10	1.0	85	15
45	1.0	60	40
50	1.0	0	100
65	1.0	0	100

1.3 质谱鉴定

将反相高效液相色谱分离的各洗脱峰收集后,用封口膜封住,上面用针头扎适量小孔,在4 °C低温浓缩仪中除去乙腈而干燥。每管洗脱物质用3 μL含5%乙腈的水溶液溶解。通过德国MALDI-TOF-TOF质谱仪(UltraFlex I, Bruker Daltonics)进行分子量鉴定。质谱仪设定的工作模式为正离子线性模式,质谱分析使用Bruker公司的多肽标样II作为外标校正。配制20 mg·mL⁻¹CCA(α-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid)饱和溶液,该溶液中含有0.1%TFA和50%乙腈。基质液超声10 min后,12 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清液即为基质溶液。待测样品与基质溶液按1:1的比例混合后,点样于96孔靶盘上,室温下风干后进行质谱分子量测定。

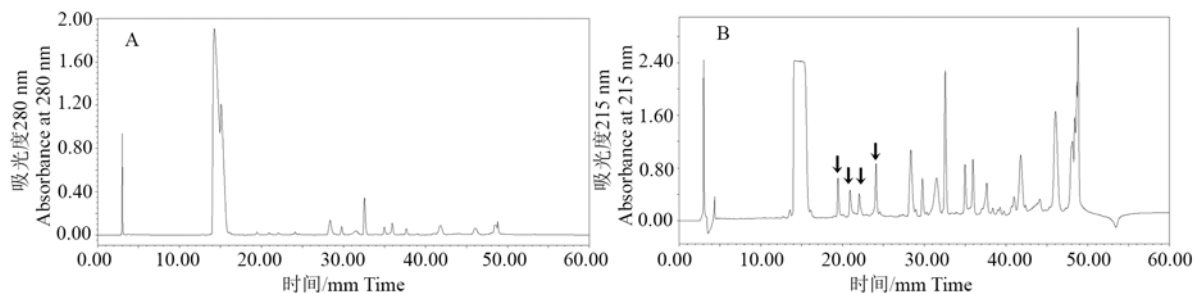
2 结果与分析

2.1 触形大疣蛛粗毒的分离纯化

溶解后的触形大疣蛛粗毒溶液样品通过反相液相色谱进行分离。从波长280 nm和215 nm检测图(图2)可以看出,大部分洗脱峰在2个波长下的洗脱时间相似,但是本实验中后者的灵敏度更高,洗脱峰更容易被识别。例如在波长215 nm检测下,洗脱峰时间分别为19.42、20.92、22.08和24.10 min的洗脱成分,其洗脱峰面积明显较大(图2B箭头处),但在波长280 nm下几乎没有。因此,本实验收集波长215 nm下检测的洗脱峰,根据不同洗脱时间共收集41个洗脱峰(图2B)。其中,具有最大洗脱峰面积的成分(其洗脱时间为15.11 min)被完全与其他成分分离开来,后续的质谱鉴定结果也证明该洗脱峰成分纯度较高;另一方面也说明本实验

所设置的洗脱梯度较为合理, 有利于粗毒中主要成分和其他成分 (尤其是低丰度成分) 较好的分离开来, 避免了质谱检测中的离子抑制作用而减少鉴定的多肽数目。另外, 本实验尝试过用不同质量粗毒

样品 (如 1.2 或 0.8 mg) 进行分离, 但是较多量容易导致某些洗脱峰无法分离, 而较少量容易导致降低后续质谱鉴定的灵敏度。因此, 采用 1.0 mg 粗毒样品通过 C18 反相柱分离, 效果最佳。



A. 280 nm 波长; B. 215 nm 波长 A. 280 nm wavelength; B. 215 nm wavelength

图 2 触形大疣蛛毒素多肽的反相色谱分离

Figure 2 Reversed-phase HPLC profile of toxin peptides from *M. palpatator*

表 2 触形大疣蛛毒素多肽的分子量

Table 2 Molecular weight of toxin peptides from *M. palpatator*

洗脱时间/min Retention time	分子量 ^a [M+H] ⁺ Molecular weight ^a [M+H] ⁺	洗脱时间/min Retention time	分子量 ^a [M+H] ⁺ Molecular weight ^a [M+H] ⁺
15.11	3323.7	32.60	5205.7
17.58	3500.0; <u>3562.8</u> ; 7210.7	33.95	3061.6; <u>3255.5</u> ; 5202.5
18.45	<u>2296.6</u> ; 2555.9	34.99	3173.8; <u>3254.3</u> ; 3747.1; 4079.4; 4898.6
18.95	2293.7; 2509.4; 3846.2; <u>5056.3</u>	35.47	<u>3174.6</u> ; 3643.7; 4900.8; 5891.4
19.42	2009.3; <u>4042.1</u>	35.90	4900.6
20.11	<u>2009.2</u> ; 2338.9; 2450.7; 2509.9; 4038.8; 4145.3; 4710.2; 4940.3; 5060.0; 5456.3	37.07	3728.6
20.92	2760.5; 3619.8; <u>5571.7</u> ; 5673.5	37.56	3729.5; <u>5096.3</u>
22.08	2760.6; 3620.4; 4159.3; 4352.0; 5450.4; <u>5573.2</u>	38.40	<u>3219.1</u> ; 5097.9
22.93	2760.8; 3619.9; <u>5573.6</u>	38.97	3075.3; 3790.6; <u>5097.4</u>
24.10	2816.0; 3386.4; 4109.4; 5679.2; <u>6849.1</u>	39.27	<u>3053.6</u> ; 5097.5
24.56	<u>3620.2</u> ; 4111.7; 5474.3; 6484.0	39.71	3102.4
25.75	3620.1; <u>4113.3</u> ; 4568.4; 6905.3; 7061.7	40.70	3120.5; <u>4491.2</u> ; 7148.0
27.00	2724.1; 2890.5; 2998.2; 3619.6; 4125.6; 4860.4; 5830.6; <u>6055.2</u> ; 6133.4; 6743.1	40.97	3074.9; 3530.7; 4074.3; <u>4490.2</u> ; 7146.3
27.36	2888.2; 3032.8; 3620.5; 4663.3; 5364.0; <u>5835.2</u> ; 6132.8	42.36	3119.8; <u>4077.3</u> ; 4490.8
28.38	2570.6; 4733.6; <u>5178.1</u>	42.85	4075.9
28.97	2571.8; 3620.8; <u>5181.6</u>	44.16	4097.7
29.76	5035.3	46.66	<u>3100.8</u> ; 3215.6
30.30	<u>2765.3</u> ; 2965.7; 3428.0; 5986.8; 6935.3	47.30	2970.6; 3057.7; <u>3200.9</u>
31.55	5984.1	47.97	<u>3057.0</u> ; 3222.8
31.99	2830.0; 2963.9; <u>5987.2</u>	48.70	3085.8
32.33	2580.3; <u>5205.7</u>		

^a 每个洗脱峰的质谱图谱中出现的最强信号峰用下划线显示。

^a The strongest signal peak in the mass spectrum of each elution peak is underlined.

2.2 分子量鉴定

从触形大疣蛛毒素多肽的质谱鉴定结果可以看出 (表 2), 大多洗脱峰的质谱图谱中会出现 2 个以

上的信号峰, 而每一个信号峰可能存在于相近洗脱时间的洗脱峰中。这与其他蜘蛛粗毒的分离效果类似。一般蜘蛛粗毒仅通过一次分离纯化, 大部分洗

脱峰成分很难完全分离，需要再经过多次反向离子交换色谱分离才能获得高纯度的单一毒素成分。究其原因，可能是粗毒中有很多疏水性相近但分子量不同的多肽分子，在分离时存在于同一或相近洗脱时间的洗脱峰中。

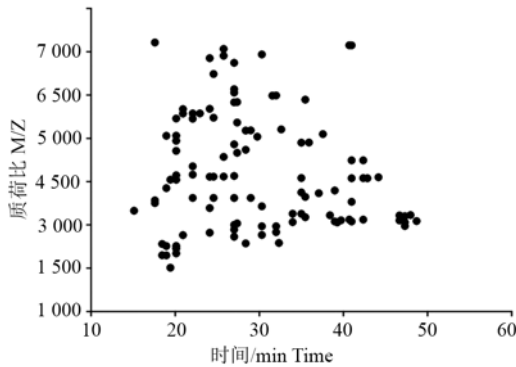
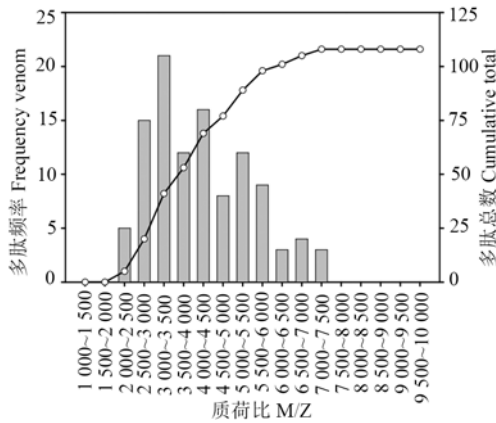


图 3 触形大疣蛛粗毒的多肽分子量分布

Figure 3 Molecular weight distribution of toxin peptides from *M. palpator* crude venom



以 500 Da 为数量级递增，上方折线图为粗毒统计的多肽总数

Frequency histogram shows the abundance of peptide toxins in the venom of *M. palpator*, sorted into 500 Da molecular weight classes. The overlaid curves indicates the cumulative total of peptide masses identified from mass spectrometry analysis

图 4 触形大疣蛛粗毒的多肽频率

Figure 4 Frequency histogram of toxin peptides from *M. palpator* crude venom

在本次实验中，从触形大疣蛛粗毒一共鉴定到 108 种不同分子量(去冗余)的多肽毒素组分(表 2)。统计数据结果表明：分子量分布图体现了触形大疣蛛粗毒多肽分子的多样性(图 3)，多肽分子量范围在 2 000~7 500 Da，但在 1 000~2 000 Da 和 7 500~10 000 Da 范围内没有分布。从分子量频率图(图 4)可以看出，触形大疣蛛粗毒中多肽分子量可分为 3 部分，主要分子量范围分布在 2 000~4 500 Da (占 63.9%)，还有一部分分布在 4 500~6

000 Da(占 26.8%)，多肽分子在 6 000~7 500 Da 范围内比例很少(仅占 9.39%)。

3 讨论与结论

触形大疣蛛是农林害虫的重要天敌，研究其粗毒成分对于如何抵抗各种虫害具有重要意义。这种蜘蛛在江西省境内分布较广，本实验室对触形大疣蛛在江西省分布做过全面调查。除采集地点(江西南昌)外，这种蜘蛛在江西其他地区也经常被发现，如临川茅排和大岗株山、婺源大鄣山、广丰铜钹山、宁都凌云山、井冈山、宜丰官山、靖安九岭山、崇仁九岭山和南丰军峰山等^[10-11]。

触形大疣蛛隶属于原蛛下目，异纺蛛科。该下目蜘蛛还包括捕鸟蛛科、地蛛科和螳螂科蜘蛛。其中，捕鸟蛛科蜘蛛^[12-15]和澳大利亚漏斗网蜘蛛(属于异纺蛛科)^[16-17]研究较为广泛，它们的毒素多肽分子量主要范围分别是 3 500~4 500 Da 和 3 000~5 000 Da，这与触形大疣蛛不同，其主要分子量范围更大些(2 000~4 500 Da)。而且，捕鸟蛛科蜘蛛和澳大利亚漏斗网蜘蛛的毒素多肽分子量的第 2 分配区域分别在 6 500~7 000Da 和 6 500~8 500 Da，而触形大疣蛛毒素多肽分子量的第 2 分配区域在 4 500~6 000 Da，因此它们在此产生了明显差异。另外，本实验也鉴定过中华狼蛛(狼蛛科)和沟纹硬皮地蛛(地蛛科)的毒素多肽成分，这 2 种蜘蛛与触形大疣蛛比较，其分子量分布特征均不相同。

本次实验通过电刺激法采集触形大疣蛛毒液后，首次对其粗毒进行高效液相色谱分离，并对其所含多肽成分进行 MALDI-TOF-TOF 质谱鉴定，并对其分子量分布特征进行了分析。这是首次对触形大疣蛛粗毒多肽研究的初探，为进一步深入研究触形大疣蛛毒素多肽多样性提供依据。

参考文献:

- [1] VASSILEVSKI A A, KOZLOV S A, GRISHIN E V. Molecular diversity of spider venom[J]. Biochemistry (Mosc), 2009, 74(13): 1505-1534.
- [2] WINDLEY M J, HERZIG V, DZIEMBOROWICZ S A, et al. Spider-venom peptides as bioinsecticides[J]. Toxins, 2012, 4(3): 191-227.
- [3] KING G F, HARDY M C. Spider-venom peptides: structure, pharmacology, and potential for control of insect pests[J]. Annu Rev Entomol, 2013, 58: 475-496.
- [4] CAO C W, LIU G F, WANG Z Y, et al. Response of the gypsy moth, *Lymantria dispar*, to transgenic poplar, *Populus simoniix* P. nigra, expressing fusion protein gene of the spiderinsecticidal peptide and Bt-toxin C-peptide[J]. J Insect Sci, 2010, 10(1):1-13.

- [5] HERNÁNDEZ-CAMPUZANO B, SUÁREZ R, LINAL, et al. Expression of a spider venom peptide in transgenic tobacco confers insect resistance[J]. *Toxicon*, 2009, 53(1): 122-128.
- [6] SHAH A D, AHMED M, MUKHTAR Z, et al. Spider toxin (Hvt) gene cloned under phloem specific RSs1 and Rol Cpromoters provides resistance against American bollworm (*Heliothis armigera*) [J]. *Biotechnol Lett*, 2011, 33(7): 1457-1463.
- [7] 胡金林, 李富江. 中国两种大疣蛛记述(蜘蛛目:长尾蛛科)[J]. *动物分类学报*, 1986, 11(1): 35-39.
- [8] 陈会明. 贵州茂兰喀斯特森林自然保护区的蜘蛛种类[J]. *山地农业生物学报*, 2003, 22(2): 127-135.
- [9] 邢树文, 朱慧. 潮州凤凰山茶园蜘蛛多样性与优势度分析[J]. *广东农业科学*, 2015, 42(21): 81-90.
- [10] 陈连水, 袁凤辉, 饶军, 等. 江西婺源旅游景区蜘蛛多样性的研究[J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(24): 13240-13245.
- [11] 黄珍, 陈连水, 吴心怡, 等. 江西境内触形大疣蛛(蜘蛛目: 异纺蛛科) 种系形态的区系演化[J]. *中国科技论文在线*, 2015, 8(19): 2067-2074.
- [12] ESCOUBAS P, RASH L. Tarantulas: eight-legged pharmacists and combinatorial chemists[J]. *Toxicon*, 2004, 43(5): 555-574.
- [13] TANG X, ZHANG Y Q, HU W J, et al. Molecular diversification of peptide toxins from the tarantula *Haplopelma hainanum* (*Ornithoctonus hainana*) venom based on transcriptomic, peptidomic, and genomic analyses[J]. *Proteome Res*, 2010, 9(5): 2550-2564.
- [14] LIAO Z, CAO J, LI SM, et al. Proteomic and peptidomic analysis of the venom from Chinese tarantula *Chilobrachys jingzhao* [J]. *Proteomics*, 2007, 7(11): 1892-1907.
- [15] YUAN C H, JIN Q H, TANG X, et al. Proteomic and peptidomic characterization of the venom from the Chinese bird Spider, *Ornithoctonus huwena* Wang[J]. *J Proteome Res*, 2007, 6 (7): 2792-2801.
- [16] ESCOUBAS P, SOLLOD B, KING G F. Venom landscapes: Mining the complexity of spider venoms via a combined cDNA and mass spectrometric approach[J]. *Toxicon*, 2006, 47(6): 650-663.
- [17] TEDFORD H W, SOLLOD B L, MAGGIO F, et al. Australian funnel-web spiders: master insecticide chemists[J]. *Toxicon*, 2004, 43(5): 601-618.