

雄性中华狼蛛毒素多肽的分离及鉴定

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, 江西 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, 湖南 长沙 410081)

摘要: 采用反向高效液相色谱对雄性中华狼蛛粗毒进行分离, 再用 MALDI-TOF-TOF 质谱进行相对分子质量测定。结果表明: 从雄性中华狼蛛粗毒中一共鉴定到 195 种毒素多肽组分, 这些毒素多肽的相对分子质量为 1 000~10 000, 其中大多数多肽的相对分子质量为 1 000~3 500 和 4 500~7 500。这些毒素多肽的相对分子质量的分布特征与已报道的其他蜘蛛的不同, 这可能是因为不同种类蜘蛛的毒素成分具有不同的多样性特点。

关键词: 中华狼蛛; 粗毒; 多肽; 相对分子质量; 多样性

中图分类号: Q959.226; R392.33 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2018)01-0071-06

Isolation and identification of peptides derived from venom in male *Lycosa sinensis*

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

Abstract: Peptides in crude venom from male *Lycosa sinensis* were isolated by means of reversed-phase high-performance liquid chromatography, and their relative mass in eluted fractions were analyzed through MALDI-TOF-TOF mass spectrometry. In total, 195 peptides were detected out with the relative mass ranged from 1 000 to 10 000. The vast majority of these peptide mass fell in the ranges of 1 000-3 500 and 4 500-7 500, respectively. Its molecular weight distribution was far dissimilar from those of other spiders reported, which is probably because venom components might vary with spider species.

Keywords: *Lycosa sinensis*; crude venom; peptide; relative mass; diversity

作物害虫(包括甲虫、蝗虫、蛾和蝶)约有 10 000 种, 它们每年造成的经济损失约 1 000 亿美元^[1-2]。目前, 农业害虫主要是通过化学杀虫剂来控制。生物杀虫剂作为新一代杀虫剂, 可替代传统农药, 已被广泛应用到农作物的抗虫害中。蜘蛛是食肉性节肢动物, 其毒液可作为超稳定杀虫剂和小分子多肽的来源, 能够使昆虫麻痹或者致死, 因此, 蜘蛛毒素多肽作为生物杀虫剂是目前研究的热门之一^[3]。

中华狼蛛(*Lycosa sinensis*)为狼蛛科狼蛛属, 其体型较大, 大多分布于中国北方地区^[4-6], 在中国南方地区也有发现^[7-8]。中华狼蛛在小麦田、玉米田、大豆田、地瓜田、棉花田、牡丹田、苹果园等田地和果林中均已被发现, 是金龟子、蛾类、棉铃虫、飞虱等多种农林害虫的重要天敌, 具有一定的农业保护价值。已有关于中华狼蛛生态和生殖习性等的报道^[4-9], 但是对其粗毒成分的研究尚少见报

收稿日期: 2017-05-17

修回日期: 2017-11-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(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项目(20114BAB214015, 20142BAB204011); 江西省教育厅青年科学基金项目(GJJ12389); 东华理工大学博士科研启动基金项目(DHBK1008); 湖南省生物发育工程及新产品研发协同中心项目(20134486)

作者简介: 唐兴(1980—), 男, 湖南衡阳人, 博士, 主要从事蜘蛛毒素多肽的鉴定和功能研究, xtang2011@sina.com

道。笔者结合 C_{18} 反向色谱和质谱鉴定雄性中华狼蛛粗毒中的多肽成分, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 供试蜘蛛

雄性中华狼蛛采集于河北唐山, 并在动物实验室进行人工饲养。

1.2 仪器与试剂

真空离心浓缩仪(mivac-duo) 由 GeneVac 公司生产; 高效液相色谱仪(Alliance)由 Waters 公司生产; C_{18} 反相柱(100 Å, 250 mm × 4.6 mm)由 Phenomenex 公司生产; MALDI-TOF-TOF 质谱仪(UltraFlex I)由 Bruker Daltonics 公司生产; α -氰基-4-羟基肉桂酸二乙胺盐、三氟乙酸、乙腈等试剂均为 Sigma 产品。

1.3 方法

1.3.1 蜘蛛粗毒的制备

用电刺激法采集蜘蛛毒液。制作一个“W”型厚透明塑料片, 用 5 V 脉冲电流刺激成体蜘蛛的 2 螯肢基部外侧 1~3 s 蜘蛛受到电刺激后螯爪刺向塑料片中间壁, 并射出毒液; 收集多个蜘蛛分泌的毒液, 在真空离心浓缩仪中冻干, 干后所得浅白色粉末即为粗毒。将粗毒冻干后于 -20 °C 保存。

1.3.2 蜘蛛粗毒的分离与纯化

用高效液相色谱仪和 C_{18} 反相柱进行分离与纯化。流动相为 2 相洗脱系统, A 液为含 0.1% 三氟乙酸(V/V)的双蒸水, B 液为含 0.1% 三氟乙酸(V/V)

的乙腈。A 液和 B 液都通过加入氦气除去溶液中的气泡。反相色谱分离的上样量为 1.0 mg。溶解后的样品溶液通过 A 泵进样, 并用 A 液脱盐, 然后用 B 液洗脱。洗脱梯度 B 液为 5%~50%(0~50 min), 流速为 1.0 mL/min。监测波长为 215 nm 或 280 nm。柱温为 25 °C。将反相色谱分离、收集到的各洗脱组分用封口膜封住, 膜上用针头扎适量小孔, 在真空离心浓缩仪中冻干。

1.3.3 质谱鉴定

用 MALDI-TOF-TOF 质谱仪测定毒素多肽的相对分子质量。采用正离子线性工作模式, 用多肽标样 II 进行外标校正。以 20 mg/mL 的 α -氰基-4-羟基肉桂酸二乙胺盐饱和溶液为基质溶液(该溶液中含有 0.1% 三氟乙酸和 50% 乙腈)。

取雄性中华狼蛛毒液 1.0 μ L, 并用双蒸水稀释至 50 倍。将反相色谱分离的各洗脱组分干燥后, 用 3.0 μ L 含 5% 乙腈的水溶液溶解。各取以上样品 1.0 μ L 与基质按 1:1 的比例混合后点样, 随后于室温下自然风干, 进行相对分子质量测定。

1.3.4 数据分析

采用 SigmaPlot 10.0 进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 雄性中华狼蛛粗毒的分离纯化结果

雄性中华狼蛛粗毒的反相色谱分离结果(图 1)表明, 在波长 215 nm 下的检测效果较好, 本试验共收集到不同洗脱时间的 37 个洗脱峰(图 1)。该波长下各洗脱峰均基本分离, 但很多洗脱峰在波长 280 nm

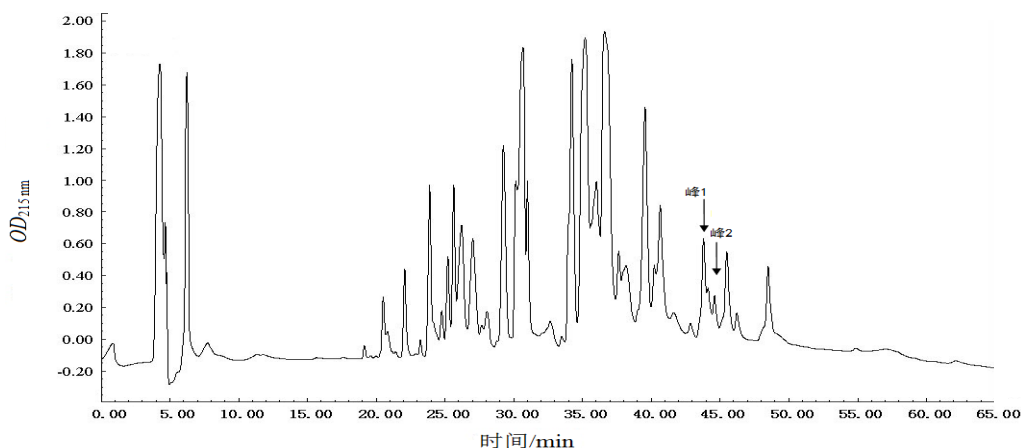


图 1 雄性中华狼蛛粗毒在波长 215 nm 的反相 HPLC 分离图谱

Fig.1 Chromatogram of peptides in venom of male *Lycosa sinensis* at 215 nm through reversed-phase HPLC

下未能检测出来(图 2)。如在波长 215 nm 下, 保留时间 43.79 min 的峰 1 和保留时间 44.62 min 的峰 2 很明显被检测出(图 1 中箭头所指), 但在波长 280 nm 下均未能检测出来。这是因为大多数蛋白质或多肽含有苯环氨基酸, 可在波长 280 nm 下进行检测, 而

对于某些不含苯环氨基酸的蜘蛛毒素多肽, 在波长 215 nm 下对其肽键进行检测更为准确。蛋白质或多肽的 $OD_{215\text{ nm}}$ 是 $OD_{280\text{ nm}}$ 的数倍, 因此, 在选择检测波长时, 波长 215 nm 比波长 280 nm 的检测结果更精确。

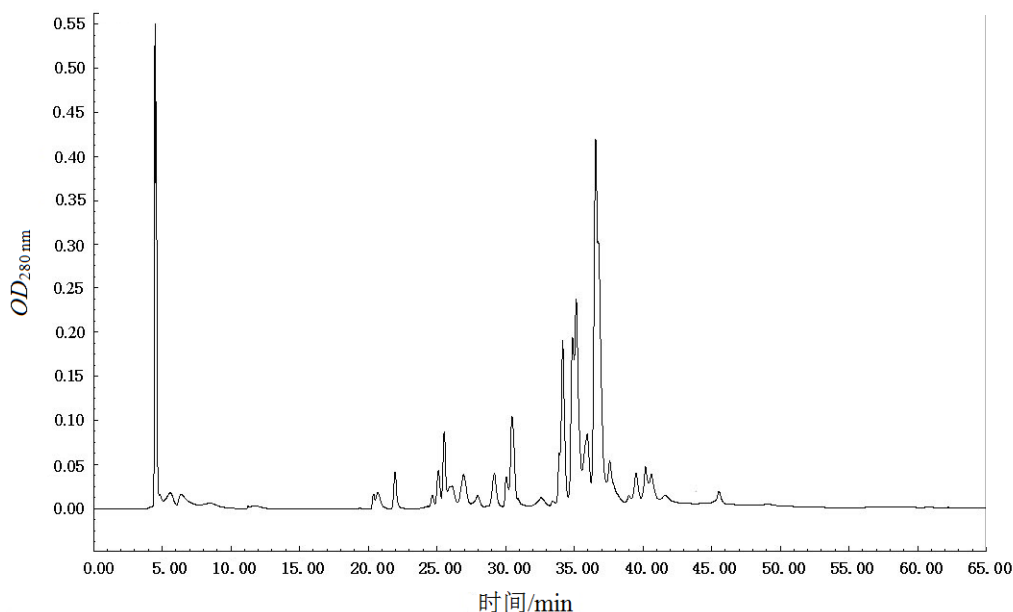


图 2 雄性中华狼蛛粗毒在波长 280 nm 的反相 HPLC 分离图谱

Fig.2 Chromatogram of peptides in venom of male *Lycosa sinensis* at 280 nm though reversed-phase HPLC

2.2 毒素多肽的相对分子质量

蜘蛛粗毒溶液的多肽成分浓度较大, 且盐含量高, 因此一般需要用双蒸水稀释至 50 或 100 倍后再进行质谱鉴定。由图 3 可见, 根据相对分子质量的大小可将雄性中华狼蛛粗毒主要成分分成 3 个区

域: 相对分子质量为 1 939.8、2 253.8、2 522.5 的区域为分子质量较小毒素多肽; 相对分子质量为 4 719.6、4 866.6、5 091.9、5 197.0、5 461.9 的区域为相对分子质量中等毒素多肽; 相对分子质量为 7 345.4 的区域为分子质量较大毒素多肽。

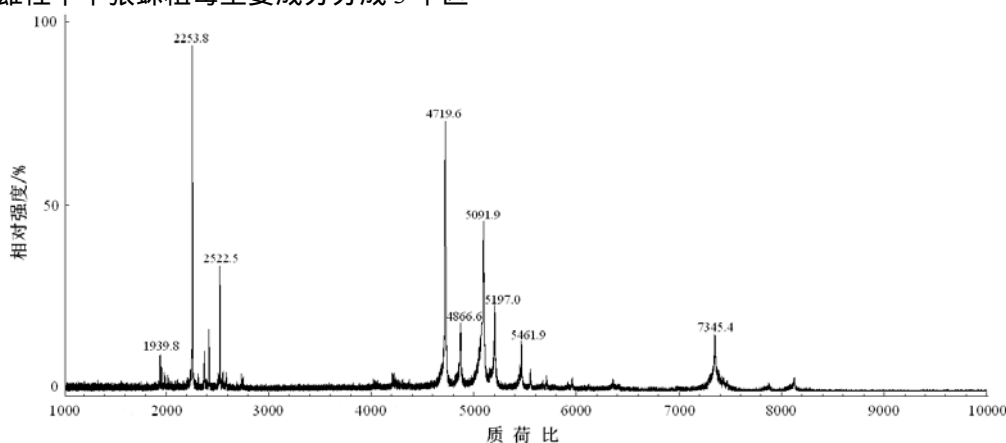


图 3 雄性中华狼蛛粗毒的 MALDI-TOF 质谱图

Fig.3 Mass spectrum of MALDI-TOF from venom in male *Lycosa sinensis*

浓缩由 C_{18} 反相色谱分离的洗脱组分, 测定其相对分子质量, 列于表 1。质谱鉴定结果显示, 大多数洗脱峰的质谱图谱中出现了 2 个以上的信号

峰, 这说明很多疏水性相近, 但相对分子质量不同的多肽分子存在于同一洗脱峰中。这些洗脱峰的质谱图谱中出现的最强信号峰为其主要成分的信号

峰。本试验分离到6个高纯度的毒素多肽,它们的质谱图谱中仅含有一个信号峰。这些成分的相对分子质量分别为1 699.4(洗脱时间为19.03 min)、4 851.9(洗脱时间为20.53 min)、1 840.1(洗脱时间为20.81 min)、1 919.6(洗脱时间为21.41 min)、2 024.5(洗脱时间为23.19 min)、7 390.2(洗脱时间为24.76 min)。

表1 雄性中华狼蛛毒素多肽的相对分子质量

Table 1 Molecular weight of peptides from venom in male *Lycosa sinensis*

洗脱时间/min	相对分子质量[M+H ⁺]
17.63	1 058.9, <u>1 072.9</u> , 1 094.0, 1 099.9, 1 673.7
19.03	1 699.4
19.58	1 072.3, 1 112.2, 1 232.6, 1 467.4, <u>1 709.0</u> , 4 702.8, 4 774.8
20.00	1 373.6, 1 665.5, 1 692.6, <u>1 777.9</u> , 1 805.5
20.53	4 851.9
20.81	1 840.1
21.41	1 919.6
21.99	1 210.1, 2 101.9, <u>8 913.4</u>
22.85	<u>1 806.8</u> , 3 991.5, 4 116.0, 7 463.1
23.19	<u>2 024.5</u>
23.88	<u>2 103.3</u> , 5 402.2, 6 737.1, 6 867.8, 7 026.3, 7 068.1, 7 108.0, 7 217.6, 7 361.2, 7 464.8
24.76	7 390.2
25.23	2 325.6, 3 719.5, 7 390.3, <u>7 446.1</u> , 7 630.2
25.64	1 679.6, 2 022.7, 2 404.0, 3 061.7, 4 003.1, 4 681.8, <u>6 936.6</u> , 7 119.2, 8 019.4, 9 381.4
26.21	2 413.6, 2 492.6, 2 531.7, 4 559.7, 4 706.2, 4 755.3, 4 801.2, 5 199.9, 5 400.9, 7 065.4 ; 7 136.7, 7 208.6, <u>8 017.3</u>
26.99	2 522.7, 2 643.7, 3 539.8, 3 996.1, 6 935.4, 7 085.9, 7 156.7, 7 233.3, 7 648.4, <u>7 946.5</u> , 8 003.6, 8 138.4
27.71	2 193.0, <u>2 373.9</u> , 7 105.8, 7 829.9, 8 137.5
28.03	1 680.3, 2 065.8, 2 099.8, 2 292.1, 2 523.9, 6 731.1, 6 933.3, 7 233.0, <u>7 648.1</u> , 7 797.6, 9 373.7
29.19	1 728.4, 1 904.2, 2 606.9, 3 058.4, 4 587.3, 7 130.5, 8 465.0, 8 790.4, <u>9 193.5</u>
30.17	3 098.9, 4 649.2, 5 637.8, 5 906.8, <u>7 117.6</u> , 9 315.1
30.68	5 885.7, <u>9 159.8</u>
30.96	2 389.9, <u>5 897.7</u> , 7 125.3, 9 175.1
32.62	1 978.5, 2 012.8, 2 209.0, 2 384.3, 2 474.0, <u>2 838.4</u> , 2 947.9, 3 278.5, 5 136.6, 5 956.3, 6 098.9
33.44	1 960.6, 2 009.4, <u>2 961.5</u> , 5 651.0
34.27	<u>4 631.4</u> , 9 278.4
35.18	2 369.3, 2 718.3, 2 961.9, 3 018.3, 3 149.5, <u>5 893.8</u> , 6 079.5, 6 798.8, 6 821.2
35.96	2 612.4, 2 704.4, <u>3 410.5</u> , 3 433.2, 5 886.5
36.60	<u>2 814.2</u> , 3 150.2
37.65	1 544.7, 2 079.5, 2 556.3, <u>3 226.7</u> , 5 457.0, 5 891.6, 6 076.6, 6 335.1
38.15	2 031.5, 2 612.8, 2 814.1, 2 983.4, <u>3 150.3</u> , 3 410.7, 4 121.9, 9 832.9
39.56	2 067.1, 2 139.9, 2 233.3, 2 556.1, <u>6 358.7</u>
40.27	2 199.7, 2 427.5, <u>2 636.8</u>
40.68	2 086.4, 2 158.8, 2 190.1, 2 202.2, 2 557.6, 3 246.7, 6 361.5, <u>6 497.2</u>
41.68	<u>2 117.8</u> , 2 282.8, 2 638.0, 6 339.9
42.83	1 943.6, 2 068.6, <u>2 141.5</u>
43.79	<u>2 425.3</u> , 2 472.4, 2 519.0
44.62	2 420.6, 2 438.3, <u>2 480.9</u> , 2 515.2

下划线部分示洗脱峰质谱图中最强信号峰对应的相对分子质量。

本次试验从雄性中华狼蛛粗毒中分离和鉴定到 195 种不同相对分子质量(去冗余)的毒素多肽,对这些毒素多肽的多样性进行分析,结果(图 4)表明,雄性中华狼蛛毒素多肽分子的相对分子质量为 1 000~10 000。由图 5 可见,雄性中华狼蛛毒素多肽的相对分子质量主要分布在 1 000~3 500(占 53.3%)和 4 500~7 500(占 32.3%)这 2 个区域,该结果与直接鉴定出的未分离粗毒的质谱结果(图 3)完全吻合,即该蜘蛛粗毒主要成分的相对分子质量 2 次鉴定都分布在相同的范围内。

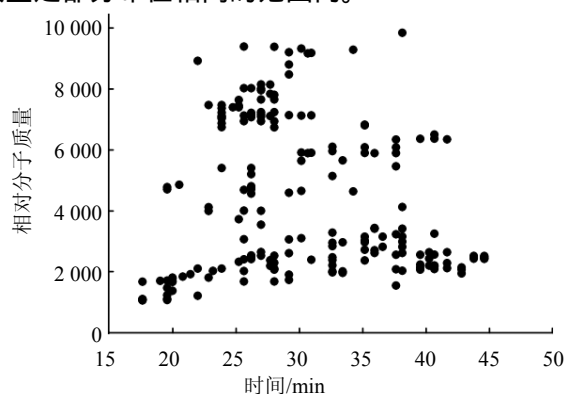


图4 雄性中华狼蛛毒素多肽的相对分子质量分布

Fig.4 Molecular weight distribution of peptides from venom in male *Lycosa sinensis*

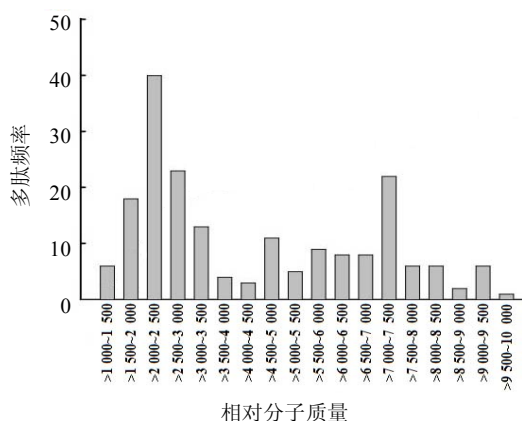


图5 雄性中华狼蛛毒素多肽的多肽频率

Fig.5 Frequency histogram of peptides from venom in male *Lycosa sinensis*

3 结论与讨论

目前,高效液相色谱和质谱常用于分离和鉴定蛋白质和多肽,也用于对蛇毒液、蝎毒液、蜂毒液、蜘蛛毒液等进行分离纯化和成分鉴定^[10-15]。蜘蛛毒液的主要成分是毒素多肽,对其进行分离和鉴定一般是先用 C_{18} 反相色谱加以分离,然后通过 MALDI-TOF-TOF 质谱测定其相对分子质量。蜘蛛

毒素多肽的相对分子质量一般小于 10 000,处于 C_{18} 反相色谱柱分离的主要相对分子质量范围。MALDI-TOF-TOF 质谱常用于鉴定蜘蛛毒素多肽的相对分子质量,具有耐高浓度盐、少碎片离子等特点,而且软电离形成的离子峰所带电荷较少(一般为 1 个),因此,洗脱组分质谱图中的多肽数很容易辨别。

捕鸟蛛毒素多肽的相对分子质量为 1 000~9 000,其主要相对分子质量分布在 3 500~4 500,因为捕鸟蛛毒素多肽多为含有 3~5 对二硫键的神经毒素^[10-11]。本研究结果表明,中华狼蛛毒素多肽的相对分子质量为 1 000~10 000,其分布范围与捕鸟蛛毒素多肽相对分子质量的分布范围基本相同。中华狼蛛毒素多肽的相对分子质量在 1 000~3 500 和 4 500~7 500,该分布范围与捕鸟蛛毒素多肽相对分子质量的主要分布范围有明显差异。狼蛛毒液中存在抗菌肽,这些抗菌肽的相对分子质量为 1 000~3 500^[16]。从穴居狼蛛毒液中也发现了大量含有 4~6 对二硫键的神经毒素多肽^[17],其肽链比捕鸟蛛毒素多肽的略长,因此,其相对分子质量也较大。将中华狼蛛(狼蛛科)、大腹园蛛(园蛛科)^[12]、间斑寇蛛(球腹蛛科)^[13]、褐腹狡蛛(盗蛛科)^[18]等蜘蛛的毒液成分进行比较,发现它们毒素多肽的相对分子质量分布存在差异。本试验结果表明,狼蛛科蜘蛛毒液的成分与其他科的存在差异,体现了不同种类蜘蛛的毒素多肽具有不同的多样性特点。

参考文献:

- [1] OERKE E C, DEHNE H W. Safeguarding production-losses in major crops and the role of crop protection[J]. Crop Protection, 2004, 23(4): 275-285. DOI: 10.1016/j.cropro.2003.10.001.
- [2] CARLINI C R, GROSSI-DE-SÁ M F. Plant toxic proteins with insecticidal properties: A review on their potentialities as bioinsecticides[J]. Toxicon, 2002, 40(11): 1515-1539. DOI: 10.1016/s0041-0101(02)00240-4.
- [3] WINDLEY M J, HERZIG V, DZIEMBOROWICZ S A, et al. Spider-venom peptides as bioinsecticides[J]. Toxins (Basel), 2012, 4(3): 191-227. DOI: 10.3390/toxins4030191.
- [4] 胡金. 中华狼蛛生态习性的初步观察[J]. 动物学杂志, 1983, 18(4): 6-7.
- [5] 董慈祥. 中华狼蛛生活习性的初步观察[J]. 昆虫天敌,

- 1990(4) : 167-168.
- [6] 田金良, 樵夫. 中华狼蛛生殖习性研究初报[J]. 四川动物, 1992, 11(1) : 11-12.
- [7] 袁凤辉, 白涛, 曹波, 等. 临川水蕹菜地节肢动物多样性研究[J]. 中国植保导刊, 2007, 27(9) : 5-8. DOI : 10.3969/j.issn.1672-6820.2007.09.001.
- [8] 袁凤辉, 陈连水, 范志刚, 等. 东乡野生稻原产地蜘蛛群落结构动态研究[J]. 植物保护, 2007, 33(6) : 103-107. DOI : 10.3969/j.issn.0529-1542.2007.06.026.
- [9] 陈军, 宋大. 狼蛛科蜘蛛的繁殖行为[J]. 蛛形学报, 1999, 8(1) : 55-62.
- [10] ESCOUBAS P, RASH L. Tarantulas : eight-legged pharmacists and combinatorial chemists[J]. Toxicon, 2004, 43(5) : 555-574. DOI : 10.1016/j.toxicon.2004.02.007.
- [11] TANG X, ZHANG Y, HU W, et al. Molecular diversification of peptide toxins from the tarantula *Haplopelma hainanum* (*Ornithoctonus hainana*) venom based on transcriptomic, peptidomic, and genomic analyses[J]. J Proteome Res, 2010, 9(5) : 2550-2564. DOI : 10.1021/pr1000016.
- [12] DUAN Z, CAO R, JIANG L, et al. A combined de novo protein sequencing and cDNA library approach to the venom analysis of Chinese spider *Araneus ventricosus*[J]. J Proteomics, 2013, 78 : 416-427. DOI : 10.1016/j.jprot.2012.10.011.
- [13] DUAN Z G, YAN X J, HE X Z, et al. Extraction and protein component analysis of venom from the dissected venom glands of *Latrodectus tredecimguttatus*[J]. Comp Biochem Physiol B, Biochem Mol Biol, 2006, 145(3/4) : 350-357. DOI : 10.1016/j.cbpb.2006.08.006.
- [14] ESCOUBAS P, QUINTON L, NICHOLSON G M. Venomics : unravelling the complexity of animal venoms with mass spectrometry[J]. J Mass Spectrom, 2008, 43(3) : 279-295. DOI : 10.1002/jms.1389.
- [15] DUCANCEL F, DURBAN J, VERDENAUD M. Transcriptomics and venomics : implications for medicinal chemistry[J]. Future Med Chem, 2014, 6(15) : 1629-1643. DOI : 10.4155/fmc.14.95.
- [16] 唐兴, 陈连水, 李江. 蜘蛛抗菌肽研究进展[J]. 生命科学, 2014, 26(10) : 1090-1095.
- [17] ZHANG Y, CHEN J, TANG X, et al. Transcriptome analysis of the venom glands of the Chinese wolf spider *Lycosa singoriensis*[J]. Zoology (Jena), 2010, 113(1) : 10-18. DOI : 10.1016/j.zool.2009.04.001.
- [18] XU X, WANG H, ZHANG F, et al. A comparative analysis of the venom gland transcriptomes of the fishing spiders *Dolomedes mizhoanus* and *Dolomedes sulfurous*[J]. PLoS ONE, 2015, 10(10) : e0139908. DOI:10.1371/journal.pone.0139908.

责任编辑: 王赛群
英文编辑: 王 库