

# 新型抗虫活性肽雷氏大疣蛛毒素4596的纯化与鉴定

唐灵芳<sup>1</sup>, 王素娥<sup>1</sup>, 刘宇<sup>1,2</sup>, 熊梦玲<sup>1</sup>, 刘玲<sup>1</sup>, 曾雄智<sup>1\*</sup>

(1. 湖南师范大学 生命科学学院, 中国湖南 长沙 410081; 2. 湖南理工学院 化学化工学院, 中国湖南 岳阳 414000)

**摘要:** 雷氏大疣蛛是我国新近鉴定的蜘蛛新种, 虽然动物学家们已经对其进行过分类地位与生态学特性研究, 然而有关抗昆虫活性成分研究的报道较少. 通过比较解剖蜘蛛毒囊、乳胶软管诱导与电脉冲刺激3种蜘蛛毒液采集技术, 发现雷氏大疣蛛毒液的最佳采集方法是电脉冲刺激采毒法. 该蜘蛛粗毒对蜚蠊50%致死剂量LD<sub>50</sub>值是1.486 mg/g. 结合阳离子交换层析和反相高效液相色谱技术从该蜘蛛粗毒中分离纯化到一种新型多肽毒素, 根据质谱分析确定其相对分子质量为4 596.38, 该毒素被命名为雷氏大疣蛛毒素-4596 (raventoxin-4596, RVTX-4596). 通过初步毒性实验证实RVTX-4596是一种新型抗昆虫毒素.

**关键词:** 雷氏大疣蛛; 雷氏大疣蛛毒素-4596; 抗昆虫毒素

中图分类号: Q503; Q516

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2010)06-0476-04

## Purification and Characterization of Raventoxin-4596, a Novel Anti-insect Peptide

TANG Ling-fang<sup>1</sup>, WANG Su-e<sup>1</sup>, LIU Yu<sup>1,2</sup>, XIONG Meng-ling<sup>1</sup>, LIU Ling<sup>1</sup>,  
ZENG Xiong-zhi<sup>1\*</sup>

(1. College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan, China; 2. Department of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan Institute of Science and Technology, Yueyang 414000, Hunan, China)

**Abstract:** The spider *Macrothele raveni* was recently identified as a new species of Genus *Macrothele*. Although zoologists have obtained information about ecological characteristics and classification position of the spider *Macrothele raveni*, studies about components of anti-insect activity in the venom of the spider have little been reported. After comparing these methods of dissecting spider poison glands and inducing spiders to vomite toxins by latex soft tubes or electrical pulse stimulus for the collection of venoms, it was found that the optimal method of gathering crude venoms from the spider *Macrothele raveni* was electrical pulse stimulus. The LD<sub>50</sub> value of the venom in cockroaches was 1.486 mg/g. Combined cation exchange and reversed-phase HPLC, a novel polypeptide toxin named RVTX-4596 was purified from the spider venom. The relative molecular mass of the toxin is 4 596.38 on the basis of the analysis of mass spectrum. According to its preliminary toxic research, it has been proved that RVTX-4596 is an anti-insect toxin.

**Key words:** *Macrothele raveni*; Raventoxin-4596; anti-insect toxin

(*Life Science Research*, 2010, 14(6): 476-479)

蜘蛛起源于泥盆纪, 是世界上最古老的物种之一. 蜘蛛毒腺是蜘蛛在亿万年进化过程中形成

的高度特化的器官, 其分泌的毒液中含有丰富多样、高效专一的生物活性分子, 能够作为化学防

收稿日期: 2010-05-09; 修回日期: 2010-10-28

基金项目: 国家大学生创新性实验计划项目(081054222); 国家973计划项目(2009CB526510)

作者简介: 唐灵芳(1988-), 女, 湖南永州人, 国家大学生创新性实验计划项目负责人; \*通讯作者: 曾雄智(1965-), 湖南新化人, 湖南师范大学副教授, 博士, 主要从事蜘蛛毒素的结构与功能研究, 电话: 0731-88872556, E-mail: xiongzhieng@yahoo.com.cn.

御武器来保存动物自身物种、捕食猎物、抵抗高等动物或疾病的侵袭。近年来的研究证明,蜘蛛毒液是有重要研究价值的生物活性物质“富矿区”,许多已探明结构的毒素多肽、蛋白质已成为开展神经生物学、细胞生物学和蛋白质化学基础理论研究、天然创新药物开发、农业生物技术应用的良好材料<sup>[1]</sup>。雷氏大疣蛛(*Macrothele raveni*)是最近在我国广西宁明县桐绵乡发现并由河北大学朱明生教授定名的六疣蛛科大疣蛛属新种<sup>[2]</sup>,主要以昆虫和其它节肢动物、蚯蚓、蜗牛等为食。以前的研究显示在该蜘蛛粗毒中存在具有溶栓活性<sup>[3]</sup>和对哺乳动物有毒多肽组分存在<sup>[4,5]</sup>,但关于该蜘蛛毒液的采集方法比较与抗虫活性成分研究报道较少,本文主要报道该蜘蛛毒液的采集方法研究与新型抗虫活性肽的纯化与鉴定。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

雷氏大疣蛛从广西宁明县桐绵乡收购,蜚蠊为湖南师范大学蛋白质化学实验室饲养, $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸、三氟乙酸、乙腈等均为国产分析纯试剂。离子交换与反相高效液相色谱仪均为美国 Waters 公司产品, MALDI-TOF/TOF 质谱仪为德国 Bruker 公司产品。

### 1.2 蜘蛛毒液采集方法

#### 1.2.1 解剖毒囊法

取活的雷氏大疣蛛,用手术剪剪去 8 条腿,一只镊子夹住头胸部,用另一只镊子将其螯肢拽出,用手术剪小心剪去螯肢外骨骼,沿螯肢上部穹隆处用镊子小心剥出毒腺。

#### 1.2.2 乳胶管诱导法

将 2 根长约 3~4 cm、内径 1.5 mm 的无色透明乳胶管捆成一束,持大镊子从侧面夹住蜘蛛胸部,这时蜘蛛便张开螯爪,马上用右手将乳胶管送入蜘蛛螯肢下方,诱使蜘蛛将螯爪插入胶管内,并射出毒液。

#### 1.2.3 电脉冲刺激法

先调节好脉冲电子采毒器的电流大小与刺激频率。采毒者用左手拇指和中指将蜘蛛固定在采毒架上,右手取干净 50 mL 塑料离心管置于蜘蛛螯爪与口器之间,让螯爪伸入塑料离心管内(这样可以避免蜘蛛唾液的污染,防止蜘蛛毒液被消化酶降解);协助者双手拿着电刺激器的两个电极分别接触蜘蛛螯爪基部 3~5 s,这时蜘蛛

会用螯肢紧紧贴着塑料离心管壁,螯爪用力刺向管内同时射出毒液。

### 1.3 蜘蛛粗毒的纯化与鉴定

#### 1.3.1 阳离子交换层析

在配备有 486 检测器的 Waters 650E 高级蛋白质纯化系统上,采用弱阳离子交换填料,使用常压自装柱(1.0 cm×10 cm)进行阳离子交换色谱。洗脱系统为:(A 液)0.1 mol/L 磷酸二氢钠;(B 液)0.1 mol/L 磷酸氢二钠;(C 液)1.0 mol/L 氯化钠;(D 液)双蒸水。洗脱梯度为 1.0 mol/L 氯化钠浓度在 60 min 内增加到 80%,磷酸盐缓冲溶液的 pH 为 6.3。

#### 1.3.2 反相高效液相色谱层析

在配备有 515 泵和 2487 双波长检测器的美国 Waters 公司反相高效液相色谱系统上进行。采用二元梯度:A 液为含 0.1%三氟乙酸水溶液,B 液为含 0.1%的乙腈,检测双波波长为 280 nm 与 215 nm,柱温箱的温度为 40 °C。

#### 1.3.3 质谱分析

在德国 Bruker 公司生产的 MALDI-TOF/TOF 质谱仪上进行,辅助基质为  $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸,正离子检测模式,仪器的控制和数据处理由 Bruker 公司开发的控制软件和工作站完成。

### 1.4 蜚蠊毒性检验

选取体重 0.7 g 左右的实验用蜚蠊分为 5 组,每组 6 只。粗毒样品用生理盐水溶解,参照其它蜘蛛毒液的半数致死剂量值,经反复实验确定雷氏大疣蛛毒对蜚蠊毒性实验的有效剂量按每克体重 2.5、2.0、1.6、1.28 mg 的剂量、每只蜚蠊 20  $\mu$ L 进行腹腔注射;空白对照组注射同样体积的生理盐水,观察统计 48 h 内蜚蠊的反应与死亡数目。50%致死剂量  $LD_{50}$  的计算公式为: $[LD_{50}] = \lg^{-1} (X_m - i (\sum P - 0.5))$ (式中: $X_m$  为最大计量对数值, $P$  为动物死亡数, $\sum P$  为各组死亡率的总和, $i$  为两组计量比的对数)。

## 2 结果与分析

### 2.1 3 种采毒方法比较

蜘蛛毒液采集使用解剖毒囊、乳胶管诱导与电脉冲刺激在内的 3 种方法,所得毒液分别用微量注射器抽取集中到不同试管中,经真空冷冻干燥后呈黄色或黄绿色的干粉,即为粗毒,置于 -20 °C 的冰箱中保存备用。实验证明解剖雷氏大疣蛛得到的毒腺是一个黄绿色囊状物体,用针

刺破毒囊壁就可以采集到毒液。这种方法简单,但必须杀死蜘蛛、拔出毒腺才能采集到毒液,不利于蜘蛛毒素资源的保护和重复利用。乳胶管诱导法取毒被动、费时,蜘蛛不易吐毒或吐毒量少,每只蜘蛛仅得到 1~2  $\mu\text{L}$  毒液。电脉冲刺激采毒法方便快捷,有利于重复利用宝贵的毒素资源,但采毒时需探索电刺激参数,如电流、电压、电刺激时间等。刺激电流如果太小蜘蛛不吐毒,而电流太大则会导致蜘蛛死亡。通过反复实

验摸索发现雷氏大疣蛛电脉冲刺激采毒的最佳条件是将电刺激器调到第 2 档(电压为 10~25 V、电流为 0.7~1.5 mA),刺激时间必须少于 8 s。在这种条件下,对雷氏大疣蛛无明显杀伤作用,大多数蜘蛛都能够吐毒,毒液体积约为 8~10  $\mu\text{L}$ ,颜色为独特的黄绿色。通过文献检索证实目前所报道的蜘蛛毒液均为无色透明的液体,只有雷氏大疣蛛的毒液呈特殊的黄绿色,非常罕见。

## 2.2 蜘蛛粗毒对蜚蠊毒性检验

表 1 雷氏大疣蛛粗毒对蜚蠊的毒性测定

Table 1 Toxicity assay of the venom from the spider *Macrothele raveni* on cockroach

Toxicity assay	Groups				
	First group	Second group	Third group	Fourth group	Control
Doses/( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )	2.50	2.00	1.60	1.28	0
Death number	6	4	3	1	0

根据表 1 中的实验结果可以计算出雷氏大疣蛛粗毒对蜚蠊的 50%致死剂量  $\text{LD}_{50}$  值为 1.486  $\text{mg/g}$ 。蜚蠊注射蜘蛛粗毒 5 min 后,身体开始往一边偏斜、不爬动、体不能翻转;针刺身体部位没有出现反应即为死亡,提示有昆虫神经毒性成分存在。

## 2.3 蜘蛛粗毒的纯化与鉴定

### 2.3.1 粗毒的阳离子交换

称取 5 mg 粗毒干粉、1.0 mL 蒸馏水溶解、10 000 r/min 冷冻离心 10 min,取上清液用 Millipore 公司生产的过滤器过滤;上阳离子交换柱、氯化钠溶液梯度洗脱、紫外检测波长为 215 nm。有 10 个离子交换峰,结果见图 1。取各离子交换峰的洗脱液经离心超滤浓缩脱盐后用生理盐水溶解,注射到蜚蠊体腔,发现保留时间在 45.6 min 的离子交换峰的洗脱液中的毒液成分使蜚蠊出现麻痹等中毒症状,因此选择此离子交换峰为目标峰进行下一步研究。

### 2.3.2 离子交换目标峰的反相高效液相色谱纯化

首先将阳离子交换目标峰洗脱液直接泵入 Luna C18 反相柱 (10 mm $\times$ 250 mm),用含 0.1% 三氟乙酸的双蒸水充分洗涤,直到 280 nm 与 215 nm 下,紫外吸收值为零;然后采用 50 min 内含 0.1% 三氟乙酸的乙腈溶液按 0~50% 的线性梯度洗脱,流速是 3.0 mL/min。第一次反相分离得到 5 个比较大的峰,选择保留时间为 34.2 min 的洗脱峰(经检测是活性成分峰)经过分析型色

谱柱第二次反相纯化时得到单一主峰,保留时间为 15.5 min (见图 2),样品液无色透明,显示样品较纯,样品经冷冻干燥后置 -20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中备用。

### 2.3.3 质谱分析

反相分离样品直接采用 MALDI-TOF/TOF 质谱仪检测显示目的主峰的相对分子质量( $\text{MH}^+$ )为 4597.38 (图 3),并且只有一个分子离子峰,显示样品非常纯,样品的分离纯化工作非常成功,同时根据目的肽相对分子质量的大小将该毒素命名为 RVTX-4596。

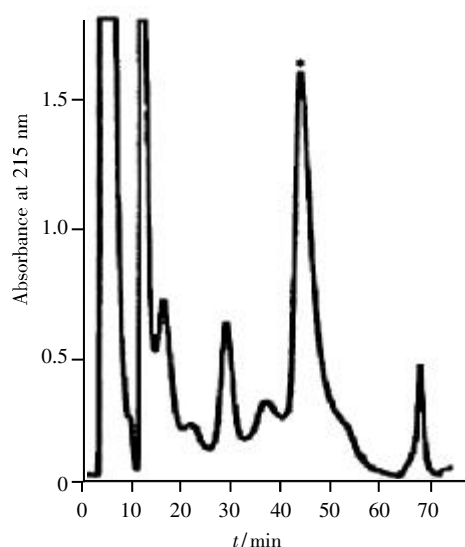


图 1 雷氏大疣蛛粗毒的离子交换图谱

Fig.1 Ion exchange HPLC of crude *Macrothele raveni* venom

\* 提示为目标峰。

\* An asterisk indicated the interest fraction.

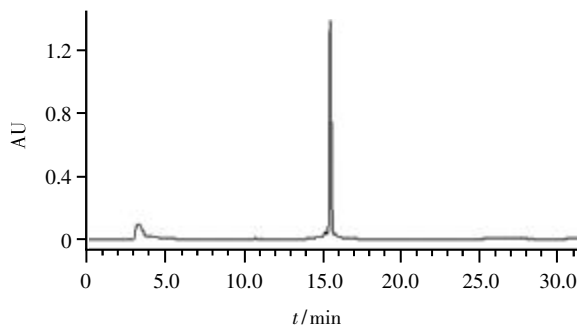


图2 雷氏大疣蛛毒素-4596的反相高效液相纯化图  
Fig.2 Purification of Raventoxin-4596 by reverse phase HPLC

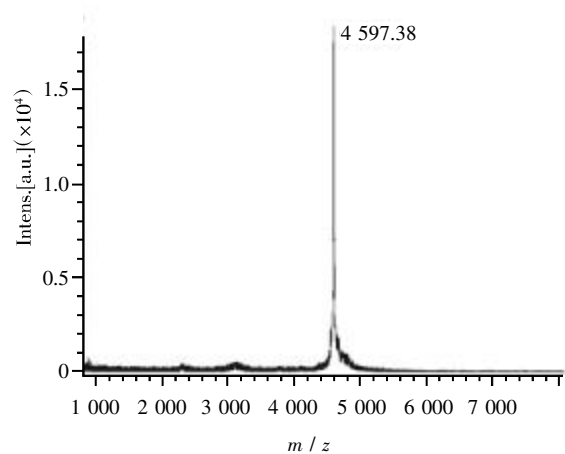


图3 雷氏大疣蛛毒素-4596的质谱分析图  
Fig.3 MALDI I-TOF/TOF mass spectrum of Raventoxin-4596

#### 2.3.4 雷氏大疣蛛毒素 4596 对蜚蠊的毒性

取 0.2 mg RVTX-4596 冻干样品用 20  $\mu\text{L}$  生理盐水溶解后直接注射美洲蜚蠊 ( $n=3$ ), 5 min 后注射蜘蛛毒素的蜚蠊开始出现身体偏向一侧, 不能翻转、后肢麻痹不受力、呆在原地不动等症状, 但 24 h 后, 发现注射毒素的蜚蠊又慢慢恢复活动, 没有死亡蜚蠊, 以上实验能够证明 RVTX-4596 具有抗昆虫活性, 是一种新型抗虫神经毒素。鉴于蜘蛛粗毒稀缺, 样品昂贵, 有关 RVTX-4596 对昆虫的有效作用靶点与量效关系以及氨基酸序列测定有待进一步深入研究。

#### 参考文献 (References):

- [1] 费瑞, 杨洋, 张丽娇, 等. 蜘蛛毒素的研究概况及应用[J]. 吉林大学学报(医学版)(FEI Rui, YANG Yang, ZHANG Li-jiao, *et al.* Advance research and application of spider venom [J]. Journal of Jilin University), 2004, 30(6): 994-996.
- [2] 朱明生, 李廷辉, 宋大祥. 中国大疣蛛属(蜘蛛目: 异仿蛛科)一新种[J]. 河北大学学报(自然科学版)(ZHU Ming-sheng, LI Ting-hui, SONG Da-xiang. A new species of genus *macrothele* (a raneae: hexathelidae) from China[J]. Journal of Hebei University), 2000, 20(4): 358-361.
- [3] 张园, 刘春燕, 李海涛, 等. 雷氏大疣蛛毒素溶栓活性测定及纤溶蛋白的分离[J]. 现代预防医学(ZHANG Yuan, LIU Chun-yan, LI Hai-tao, *et al.* Isolation of fibrinolysin and determination of the spider venom from *macrothele raveni*[J]. Modern Preventive Medicine), 2008, 35(14): 2746-2759.
- [4] 曾雄智, 梁宋平. 雷氏大疣蛛毒素-II 的纯化与初步毒性研究[J]. 生命科学研究(ZENG Xiong-zhi, LIANG Song-ping. Purification and preliminary toxic research of raventoxin-II, a neurotoxic peptide from the venom of the spider *macrothele raveni*[J]. Life Science Research), 2001, 5(3): 21-220.
- [5] ZENG Xiong-zhi, XIAO Qiao-bing, LIANG Song-ping. Purification and characterization of raventoxin-I and raventoxin-III, two neurotoxic peptides from the venom of the spider *Macrothele raveni*[J]. Toxicon, 2003, 41(6): 651-656.