

雌性和雄性虎纹捕鸟蛛粗毒蛋白质含量比较分析

段志贵, 王美迟*, 胡朝曦, 刘 珍

(湖南师范大学 生命科学学院, 蛋白质化学及发育生物学教育部重点实验室, 中国湖南 长沙 410081)

摘要: 自然界虎纹捕鸟蛛雌蛛数量远多于雄蛛数量, 为了探究雌、雄蛛粗毒的差异, 用不同方法比较了单个虎纹捕鸟蛛雌、雄蛛粗毒的特征。雌蛛单次螫毒量为 (26.5 ± 2.47) μL , 冻干后粗毒质量为 (5.01 ± 0.78) mg, 明显高于雄蛛单次螫毒量 (10.83 ± 1.35) μL , 冻干后粗毒质量 (2.05 ± 0.17) mg; 用 Lowry 法和 Bradford 法测定雌蛛和雄蛛粗毒的蛋白质含量, 两种方法均表明雄蛛粗毒中蛋白含量高于雌蛛。用反相高效液相色谱分离雌蛛和雄蛛粗毒蛋白, 并 215 nm 检测色谱图, 发现大部分洗脱峰重叠, 而雄蛛色谱图中多两个主峰。Tricine SDS-PAGE 电泳分析表明雌蛛粗毒相对分子质量小于 10 kD 的蛋白质含量较高; 而 Tris SDS-PAGE 电泳分析表明雌蛛粗毒相对分子质量大于 10 kD 的蛋白质含量较低。基于雌蛛和雄蛛粗毒蛋白含量的差异, 有必要对虎纹捕鸟蛛雌、雄蛛粗毒进行独立研究。

关键词: 虎纹捕鸟蛛; 雌蛛; 雄蛛; 蛋白质

中图分类号: Q512

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2013)02-0106-05

Comparative Analysis of Female and Male *Ornithoctonus huwena* Crude Venom Protein Content

DUAN Zhi-gui, WANG Mei-chi*, HU Zhao-tun, LIU Zhen

(Key Laboratory of Protein Chemistry and Developmental Biology of the Ministry of Education, the College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan, China)

Abstract: The number of female spiders *Selenocosmia huwena* is greater than that of male spiders in nature. In order to investigate the differences in the venom of female and male spiders, the basic characteristics of their venoms were studied by using various methods. Female single sting venom was (26.5 ± 2.47) μL and it was significantly higher than that (10.83 ± 1.35) μL of male; Lyophilized crude venom quantity of a female or male spider was (5.01 ± 0.78) mg and (2.05 ± 0.17) mg, respectively. Using Lowry and Bradford methods to determine the protein content, it was shown that protein content in the venom of male spider was greater than that in the venom of female spider. The female and male spider venoms were separated by using reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) at 215 nm. The elution profiles showed that most of the peaks were overlapped and two unique peaks were present in male's chromatogram. Tricine SDS-PAGE analysis showed female spider venom contained higher content of proteins/peptides with molecular weight less than 10 kD than male spider venom. In contrast, female spider venom was proved by Tris SDS-PAGE analysis to have lower content of proteins with molecular weight greater than 10 kD than male spider venom. Because of the differences, the crude venoms of male and female should be studied respectively.

Key words: *Selenocosmia huwena*; female spider; male spider; protein

(*Life Science Research*, 2013, 17(2): 106~110)

收稿日期: 2013-01-09; 修回日期: 2013-03-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31000477); 高等学校博士学科点专项科研基金资助课题(20104306120005); 湖南省教育厅基金资助项目(10C0961, 09C756); 湖南师范大学蛋白质化学与发育生物学教育部重点实验室开放基金课题(DF1111, DF1104); 湖南师范大学青年科学基金项目(110634)

作者简介: 段志贵(1980-), 男, 湖南永州人, 博士, 实验师, 主要从事蜘蛛蛋白质结构与功能研究; *通讯作者: 王美迟(1977-), 女, 湖南株洲人, 博士, 湖南师范大学生命科学学院副教授, 主要从事蜘蛛毒素的结构与功能研究, Tel: 0731-88872556, E-mail: wangmeichi@hunnu.edu.cn.

虎纹捕鸟蛛(*Ornithoctonus huwena*)是一种大型有毒的穴居蜘蛛, 主要分布在我国北回归线以南的热带季风区域内, 因其身体多毛, 腹部背面有虎皮状花纹而得名^[1]. 成年雌蛛较雄蛛个体大, 成年代表性雌蛛长约 50 mm, 而雄蛛约 44 mm^[2, 3]. 颜亨梅等^[4]对虎纹捕鸟蛛的生物生态学特征进行了系统的研究, 统计雌性成体平均体重为 32.17 g, 雄性成体平均体重为 11.31 g. 本研究室从 20 世纪 90 年代初开始对虎纹捕鸟蛛毒液中毒素的结构和功能进行深入的研究, 发现了数 10 种有生物活性的多肽成分^[4-10]. 这些多肽功能复杂多样, 有钠离子通道抑制剂^[8, 11, 12]及钙离子通道抑制剂^[10, 11]; 有些是对昆虫有选择性作用^[6, 9], 有的对昆虫和哺乳动物都有作用^[12]. 袁春华等^[13]也通过蛋白质组分析方法结合多维色谱技术对虎纹捕鸟蛛粗毒进行了一个系统、全面的毒素组学分析, 对 10 kD 以下的多肽组分进行纯化, MALDI-TOF 质谱鉴定到 133 种组分, 并利用 Edman 降解技术测定了其中 47 种多肽的氨基酸序列. 对相对分子质量 10 kD 以上的蛋白质, 利用 2-DE 分离, PDQUEST 软件分析, 发现了大约 300 个蛋白质点, 准确鉴定到 90 种蛋白质, 包括一些具有重要生物学意义的蛋白酶、结合蛋白质和调控蛋白质等. 然而购买或采集来的试验所用蜘蛛粗毒是雌蛛和雄蛛的混合毒液, 而且根据自然界雌蛛和雄蛛存在的自然比例大约 90~100:1. 雌蛛与雄蛛的混合粗毒往往覆盖了雄蛛粗毒的特征. 它们之间是否存在差异仍然未知.

现从新的视角出发, 对虎纹捕鸟蛛雌性和雄性粗毒蛋白质含量进行初步比较. 将自然采集来的雌蛛和雄蛛单笼饲养, 雌、雄分别编号, 每个蜘蛛均采用一次性 EP 管采集毒液, 计量体积, 编号分管冻干保存. 这样保证了每份试验材料来源于不同的蜘蛛个体. 对每份雌蛛和雄蛛粗毒分别称量, 测定蛋白质含量, 并统计数据比较雌蛛和雄蛛粗毒蛋白含量的差异; 为了比较雌蛛和雄蛛多肽分布的差别, 我们对其进行了反相高效液相色谱; 为了分析差异蛋白的分布区间, 对相对分子质量 10 kD 以上的蛋白质和相对分子质量 10 kD 以下的多肽和蛋白质分别进行 SDS-PAGE 电泳, 并进行比较分析.

1 材料与方法

1.1 试验材料与仪器设备

虎纹捕鸟蛛雌蛛、雄蛛采自广西宁明县桐棉

乡; 丙烯酰胺、N, N-亚甲基双丙烯酰胺、三羟甲基氨基甲烷、十二烷基硫酸钠、甘油等为 Amresco 公司产品; 考马斯亮蓝 R-350 染料为 Sigma 公司产品; 四甲基乙二胺(TEMED)为 SERVA 公司产品; 甲醇、冰醋酸、醋酸铵、乙腈等其他试剂为国产分析纯试剂; 自制电刺激仪、宁波新芝生物科技股份有限公司的 SCIENTZ-30ND 真空冷冻干燥仪、Bio-Rad 公司电泳槽、清华紫光扫描仪等; Waters 2695 色谱仪和希庚色谱公司 Higgins 分析柱.

1.2 试验方法

1.2.1 蜘蛛毒液的采集及冻干保存

虎纹捕鸟蛛采自广西宁明县桐棉乡的山地和农区, 放入肥皂盒内活体带回, 置于模仿生态房饲养, 1~2 d 后采集毒液. 将一个内径 3 cm, 高 5 cm 的塑料杯固定在铁架台上作为毒液接收皿, 用纱布包好的大镊子从侧面夹住蜘蛛胸部, 让蜘蛛张开螯爪并深入杯内, 然后用 25~50 V、15~40 Hz 的脉冲电流刺激螯爪基部 3~5 s, 蜘蛛马上将触肢紧紧抱住杯壁, 螯爪用力刺向杯壁并射出微黄透明的毒液. 用微量注射器吸取并计量毒液的体积, 读数然后每个蜘蛛的毒液单管收集转移至进口 EP 管里, 真空冻干并称重.

1.2.2 两种不同方法测定蜘蛛粗毒蛋白质含量

1.2.2.1 Lowry 法测定蛋白质含量

分别称取若干个雌蛛和雄蛛粗毒冻干粉, 配成 1 g/L. 按 Lowry 法进行, 以牛血清清蛋白(BSA)为标准, 测定粗毒溶液的浓度.

1.2.2.2 Bradford 法测定蛋白质含量

分别称取若干个雌蛛和雄蛛粗毒冻干粉, 配成 1 g/L 的粗毒溶液. 采用 Bradford 法测定蛋白质含量, 以 BSA 为标准蛋白质制定标准曲线, 测定粗毒溶液的浓度.

1.2.3 粗毒的反相高效液相色谱

取等量毒液, 稀释在 ddH₂O 中, 上样到 Higgins Analytical C4 (250×4.6 mm) 的柱子. 两相流动洗脱系统, A 液为含 0.1% TFA(V/V) 的双蒸水, B 液为含 0.1% TFA(V/V) 的梯度乙腈溶液, 流速为 1.0 mL/min. 检测波长为 215 和 280 nm.

1.2.4 粗毒的 SDS 电泳分离

蜘蛛粗毒溶于 200 μL H₂O 中, 转移溶液到专用离心柱, 柱内放置 10 kD 的超滤膜, 柱下方套一个离心管, 10 000 转离心 15 min, 离心管内是相对分子质量小于 10 kD 的待测样品, 柱内未离心下去的是相对分子质量大于 10 kD 的待测样

品. 相对分子质量小于 10 kD 的样品采用 Tricine SDS-PAGE 胶分离. 4.8%的浓缩胶, 12.5%的分离胶. 电泳完成后考马斯亮兰法显色. 相对分子质量大于 10 kD 的部分参照 Laemmli (1970)的方法用普通的 SDS-PAGE 方法分离. 参照 Bio-Rad 公司方法进行. 采用 Tris-甘氨酸不连续凝胶系统, 4.8%的浓缩胶, 14%的分离胶. 25 mA 恒流电泳至待溴酚蓝前沿移至分离胶与浓缩胶界面时, 调整电流至 50 mA, 电泳至溴酚蓝线距胶下沿 1 cm 处时停止. 将凝胶置于考马斯亮蓝染色液(0.1%考马斯亮蓝, 30%甲醇, 10%冰乙酸)中染色约 1 h, 去掉染色液后, 蒸馏水洗一次, 随后加脱色液(甲醇:水:冰乙酸 =3:6:1)脱色至背景清晰.



图 1 虎纹捕鸟蛛雌蛛(左)和雄蛛(右)

Fig.1 Female(left)and male(right) *Selenocosmia huwena*

1.3 数据分析

所有数据均采用平均值 (mean)±标准误差 (SEM), 观察两组数据进行结果比较, 以 $P<0.01$ 说明有显著差异, 有统计学意义.

2 结果

2.1 雌、雄蜘蛛的一次螫毒毒液体积计量及冻干后的称重分析

自然生长的成年雌蛛个体较同龄成年雄蛛个体大, 健壮. 如图 1, 左边为成年雌蛛, 右边为成年雄蛛. 单个雌蛛螫入管内的毒液体积较雄蛛螫入的量, 雌蛛一次螫毒的平均体积为 $(26.5\pm 2.47)\mu\text{L}$, 而雄蛛一次螫毒的平均体积为 $(10.83\pm 0.78)\mu\text{L}$ ($P<0.01$). 将以上粗毒分管冻干, 雌蛛的粗毒质量为 $(5.01\pm 1.35)\text{mg}$, 雄蛛的粗毒质量为 $(2.05\pm 0.17)\text{mg}$ ($P<0.01$). 结果表明虎纹捕鸟蛛雄蛛每次螫毒量明显小于雌蛛.

2.2 雌、雄蜘蛛粗毒的蛋白质含量测定

虽然单个雌蛛的毒液体积及冻干质量都高于雄蛛, 但是毒液中蛋白质的含量是否有差异仍然未知. 为此, 我们使用两种不同的方法测定了雌蛛和雄蛛的毒液蛋白质含量. 根据表 2 数据表明, 使用 Lowry 法测得雌蛛粗毒中蛋白质含量范围为 50.59%~79.17%之间, 平均含量为 $60.99\%\pm 9.12\%$,

表 1 雌、雄蜘蛛毒液的体积及冻干后质量列表

Table 1 Female and male spider venom volume and crude quality list

Female spider number	Venom volume/ μL	Crude weight/mg	Male spider number	Venom volume/ μL	Crude weight/mg
F1	25	4.02	M1	6	1.43
F2	30	6.48	M2	8	1.69
F3	36	7.94	M3	11	2.11
F4	26	4.89	M4	13	2.25
F5	18	2.60	M5	15	2.46
F6	24	4.11	M6	12	2.38
Total	26.5 ± 2.47	5.01 ± 0.78		10.8 ± 1.35	2.05 ± 0.17

雌蛛蛋白质含量范围 65.10%~67.74%之间, 平均蛋白质含量为 $66.13\%\pm 0.82\%$ ($P<0.01$). Bradford 法测定雌蛛粗毒中蛋白质含量范围为 30.6%~53.9%之间, 平均蛋白含量为 $42.83\%\pm 6.75\%$ (见图表 3). 雄蛛蛋白质含量范围 48.6%~60.9%之间, 雄蛛的平均含量为 $56.27\%\pm 3.86\%$ ($P<0.01$). 虽然

两种方法测定蛋白的原理不同, 但两种方法均表明雄蛛的蛋白质含量高于雌蛛.

2.3 雌、雄蜘蛛毒液的反相高效液相色谱

取等体积的雌、雄蜘蛛毒液进行反相高效液相色谱分离, 洗脱时间从 0~60 min, 洗脱液 A 为含 0.1% TFA 的 ddH_2O , 洗脱液 B 中乙腈浓度从

表 2 用 Lowry 法测定雌、雄蜘蛛粗毒的蛋白质含量

Table 2 The protein content determination of female, male crude toxins by Lowry method

Female spider number	Crude weight/mg	Protein content/(%)	Average protein content	Male spider number	Crude weight/mg	Protein content/(%)	Average protein content/(%)
HW35	4.02	53.22		HW13	2.25	67.74	
HW24	7.94	50.59	60.99 ± 9.12	HW11	2.25	65.54	66.13 ± 0.82
HW5	6.48	79.17		HW12	2.46	65.10	

表 3 用 Bradford 法测定雌、雄蛛粗毒的蛋白质含量

Table 3 The protein content determination of female, males crude toxins by Bradford method

Female spider number	Crude weight/mg	Protein content/(%)	Average protein content/(%)	Male spider number	Crude weight/(mg)	Protein average content/(%)	Average protein content/(%)
HW39	2.60	44.0		HW2	1.73	48.6	
HW43	7.40	53.9	42.83±6.75	HW7	1.82	59.3	56.27±3.86
HW41	6.06	30.6		HW8	2.38	60.9	

0 逐步上升到 60%, 洗脱速度为 1 mL/min. 将图 2 中 A 图与 B 图进行比较发现, 大部分主峰出峰时间相同, 只是代表多肽或蛋白量的峰面积不完全相同. A 图中的峰面积大, 说明雌蛛该峰所代表的蛋白质或多肽含量比雄蛛中高. 但仔细比较发

现, 在图 2B 箭头所示的位置, 雄蛛的色谱图中多了两个小主峰, 分别在 20 min 和 31 min, 此时洗脱乙腈浓度分别是 20% 和 31%, 暗示了雄蛛毒液中有不同于雌蛛的独特多肽或蛋白.

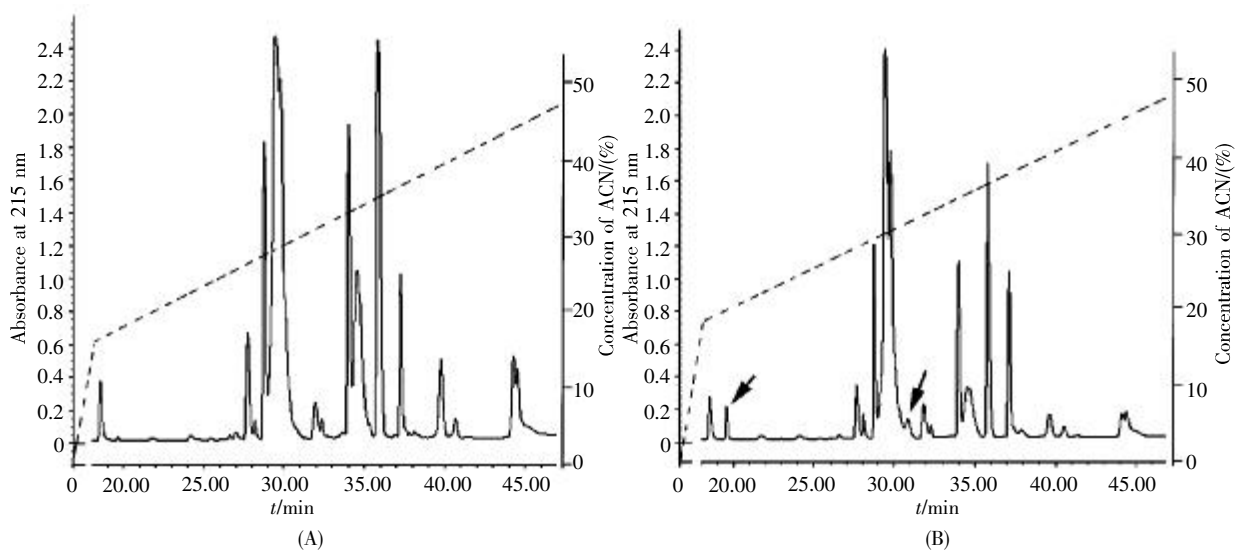


图 2 雌、雄蛛毒液的反相高效液相色谱

(A) 雌蛛; (B) 雄蛛 ($n=3$); 虚线: 洗脱液中乙腈的浓度; 箭头: 雄蛛毒液中独特的 2 个主峰.

Fig.2 Reversed phase high performance liquid chromatography of female and male venom

(A) male venom; (B) male venom ($n=3$); the dotted line shows the concentration of ACN in elution; the arrow shows the unique main peaks in male venom.

2.4 雌、雄蜘蛛粗毒的蛋白质电泳分析

虽然雌、雄单个蜘蛛蛋白质含量有差异, 雄蛛蛋白质含量高, 但色谱结果表明多肽或蛋白在雌蛛中含量高. 为此我们使用 SDS 电泳的方法测定了整体蛋白质的差异分布. 利用 tricine SDS-PAGE, 测定相对分子质量 10 kD 以下多肽和蛋白质的差异, 结果如图 3 所示, 粗毒中相对分子质量 10 kD 以下的蛋白质含量有差异, 雄蛛蛋白的量比雌蛛含量少, 该结果与色谱结果一致 (见图 3). 利用 Tris SDS-PAGE, 测定了相对分子质量 10 kD 以上多肽和蛋白质的差异, 结果如图 4 所示: 相对分子质量 10 kD 左右的蛋白质雄蛛含量比雌蛛高, 而雌蛛和雄蛛毒液中 4~5 kD 的蛋白质也存在种类的差异.

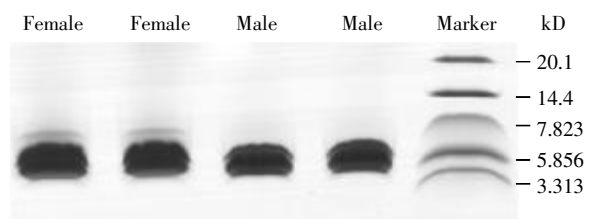


图 3 单个雌、雄蛛粗毒相对分子质量小于 10 kD 的蛋白质组分的 tricine SDS-PAGE 图

Fig.3 Tricine SDS-PAGE diagram of a single female, male spider venom of molecular weight less than 10 kD proteins

3 讨论

虎纹捕鸟蛛雌、雄蜘蛛采自广西南明县桐棉乡的山地, 带回实验室分笼饲养, 可以重复采毒. 但是实验室第一次采集的毒液往往量多且浓度较

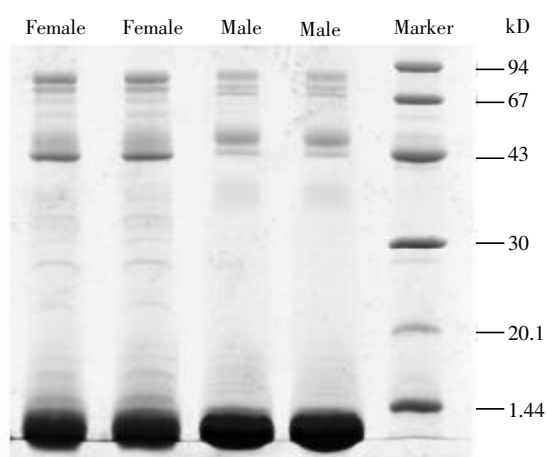


图 4 单只雌、雄蜘蛛毒液相对分子质量大于 10 kD 的蛋白质组分的 Tris SDS-PAGE 图

Fig.4 Tris SDS-PAGE diagram of a single female, male spider venom of molecular weight more than 10 kD proteins

高, 颜色偏黄, 质量最好. 本论文全部采用第一次采集毒液的数据及样品. 自然界自然生长的成年雌蛛较成年雄蛛数量多, 虽然没有文献报道其确切的存在比例, 但我们本批次共采集了 600 只蜘蛛, 其中雌蛛 594 只, 雄蛛 6, 比例为 99:1. 以前采集的不同批次情形类似, 雌蛛数量大大超过雄蛛. 平时所指的粗毒是收集雌、雄蜘蛛混合毒液后冻干的粗毒. 本研究中单个蜘蛛分开采集毒液并冻干保存粗毒, 保证了试验材料的单一来源及纯度. 试验结果表明雌蛛较雄蛛体积大, 单次螫毒量多, 冻干后得到的干粉粗毒也较多.

采用两种原理不同的方法分别对粗毒蛋白质进行定量. Lowry 法利用蛋白质在碱性溶液中其肽键与 Cu^{2+} 螯合, 形成蛋白质—铜复合物, 此复合物使酚试剂的磷钼酸还原, 产生蓝色化合物, 利用蓝色深浅与蛋白质浓度的线性关系作标准曲线并测定样品中蛋白质的浓度. 而粗毒中包含的大量小分子物质、氨基酸等具有双缩脲反应, 可能导致测定结果偏高. 为此, 我们又采用了考马斯亮蓝法. 该方法利用在酸性溶液中, 染料与蛋白质中的碱性氨基酸(特别是精氨酸)和芳香族氨基酸残基相结合. 避免了如干扰 Lowry 法的 K^+ 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、Tris 缓冲液、糖和蔗糖、甘油、巯基乙醇、EDTA 等的干扰, 测定结果更接近真实数据. 但不是所有的蛋白质均能与染料结合显色, 可能导致测定结果偏低. 事实也证明蜘蛛粗毒中蛋白质含量用 Bradford 法比 Lowry 法测定结果偏低. 但两种方法的测定结果都表明等量粗毒中雄蛛毒液的

蛋白质含量高于雌蛛的蛋白质含量. 也许这弥补了捕食、防御过程中雄蛛总螫毒量明显小于雌蛛的特点.

粗毒中主要包含三类物质: 第一类为小分子物质(相对分子质量小于 1 kD), 主要包括有机酸、生物胺、神经递质等; 第二类为相对分子质量在 1~10 kD 之间的多肽类毒素; 第三类为相对分子质量 10 kD 以上的蛋白质类, 主要是一些高分子质量毒素和蛋白酶等. 其中研究得最为深入的是第二类多肽毒素, 大多为神经毒素, 选择性作用于不同亚型的钠、钾、钙离子通道及其它种类的细胞受体, 引发一系列细胞活动从而产生个体中毒现象. 为了解雌蛛和雄蛛毒液中多肽组分的差异, 我们对其进行了反相高效液相色谱分离. 鉴于试验直接对粗毒进行分离, 分子复杂, 我们采用 C4 柱分离. 反相高效液相色谱分离得到的主要是第二类物质, 反相色谱结果显示等体积毒液, 雌蛛的多肽含量总量高于雄蛛. 雄蛛毒液中有独特的主峰, 暗示存在独特的多肽类毒素. 是否这些独特的多肽类物质对雄蛛的捕食和防御具有独特的意义还有待研究.

为了知道雌性蜘蛛和雄性蜘蛛粗毒总蛋白质分布的差异. 我们对相对分子质量大于 10 kD 和小于 10 kD 的蛋白质分别进行了电泳. 结果表明雌蛛和雄蛛的蛋白质分布确实存在一定的差异. 相对分子质量小于 10 kD 的蛋白质, 雄性蜘蛛毒液组分比较少; 而相对分子质量大于 10 kD 的蛋白质, 雌蛛的蛋白质量偏高, 主要集中在相对分子质量 10 kD 左右的蛋白量明显高.

以上结果表明雌蛛毒液和雄蛛毒液的量确实有差异, 所含蛋白质的分布也存在差异, 暗示了我们雄蛛毒液有单独研究的必要性.

参考文献(References):

- [1] 颜亨梅, 王洪全, 卢岚, 等. 中国虎纹捕鸟蛛的生态学[J]. 动物学报(YAN Heng-mei, WANG Hong-quan, LU Lan, et al. Ecology of the theraphosid *Selenocosmia huwena* from China[J]. Acta Zoologica Sinica, 2000, 46(1): 44-51.
- [2] 王智, 颜亨梅, 王洪全. 虎纹捕鸟蛛的饲养与繁殖技术[J]. 激光生物学报(WANG Zhi, YAN Heng-mei, WANG Hong-quan. Research of breeding and manifold technique on *Selenocosmia huwena*[J]. Acta Laser Biology Sinica, 1999, 8(4): 312-315.
- [3] 尹长民, 鲍幼惠. 虎纹捕鸟蛛雄蛛的修订(蜘蛛目: 捕鸟蛛科)[J]. 蛛形学报(YIN Chang-min, BAO You-hui. A revision of male spider of *Selenocosmia huwena* wang et al. 1990 (Araneae: Theraphosidae)[J]. Acta Arachnologica, 1995, 4(2): 131-133.

(下转第 142 页)