

综述

间斑寇蛛毒素的蛋白质化学与蛋白质组学研究新进展

王贤纯, 梁宋平

湖南师范大学生命科学学院 蛋白质化学与发育生物学教育部重点实验室, 湖南 长沙 410081

王贤纯, 梁宋平. 间斑寇蛛毒素的蛋白质化学与蛋白质组学研究新进展. 生物工程学报, 2014, 30(7): 1036-1043.

Wang XC, Liang SP. Recent progress in protein chemistry and proteomics of *Latrodectus tredecimguttatus* toxins. Chin J Biotech, 2014, 30(7): 1036-1043.

摘要: 间斑寇蛛 *Latrodectus tredecimguttatus* 俗称“黑寡妇”蜘蛛。其毒素不仅存在于毒腺中, 而且存在于其身体的其他部分、卵粒甚至新生幼蛛体内。研究间斑寇蛛毒腺和毒腺外材料中的毒素成分, 探明它们之间的异同、进化关系和生物学作用, 具有重要的理论和实际意义。现代蛋白质化学和蛋白质组学技术的发展为间斑寇蛛蛋白质和多肽毒素的研究提供了有效手段, 从而可以同时从单一纯化蛋白质和组学的层面探究毒素作用的分子基础和作用机制。到目前为止, 间斑寇蛛毒素的蛋白质化学与蛋白质组学研究已取得一定的进展, 但相关研究尤其是毒腺外材料来源的毒素研究还有待进一步深入。

关键词: 毒素, 蛋白质, 多肽, 间斑寇蛛, 进展

Recent progress in protein chemistry and proteomics of *Latrodectus tredecimguttatus* toxins

Xianchun Wang, and Songping Liang

Key Laboratory of Protein Chemistry and Developmental Biology of Ministry of Education, College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan, China

Abstract: *Latrodectus tredecimguttatus* (commonly known as black widow spiders) have toxins not only in their venom glands, but also in other parts of their body, in their eggs and even in the newborn spiderlings. The study on the toxins in

Received: February 27, 2014; **Accepted:** June 3, 2014

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 31070700, 31271135), National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2010CB529800), Cooperative Innovation Center of Engineering and New Products for Developmental Biology of Hunan Province (No. 20134486).

Corresponding author: Xianchun Wang. Tel: +86-731-88872556; E-mail: wang_xianchun@263.net

国家自然科学基金 (Nos. 31070700, 31271135), 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2010CB529800), 湖南省生物发育工程及新产品研发协同创新中心经费 (No. 20134486)资助。

网络出版时间: 2014-06-27

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.140118.html>

venom and materials outside the venom glands of the spiders to elucidate their differences and similarities, evolutionary relationship and biological functions is of important theoretical and applicable significance. The development of modern protein chemistry and proteomics techniques has provided efficient means for the study of protein and peptide toxins of *L. tredecimguttatus*. By using such techniques, the molecular base and action mechanism of the toxins can be revealed at the levels of both single purified proteins and omics. Up to now, although protein chemistry and proteomics study on *L. tredecimguttatus* toxins have achieved a certain progress, the relevant work particularly that on the toxins in the materials outside the venom glands has to be further deepened.

Keywords: toxin, protein, peptide, *Latrodectus tredecimguttatus*, progress

间斑寇蛛 *Latrodectus tredecimguttatus* 俗称“黑寡妇”蜘蛛，属于节肢动物门，蛛形纲，蜘蛛目，球蛛科。国外主要分布于地中海沿岸各国，在国内主要分布于新疆、云南、内蒙古、甘肃等地^[1-2]。间斑寇蛛是目前世界上已知毒性最强的蛛种之一，经常给人、畜造成伤害，甚至导致死亡^[2-4]。2000–2002年，我国新疆的哈密、奇台、青河、库尔勒等地出现间斑寇蛛的大爆发，发生多起间斑寇蛛伤害人、畜的事件，引起当地政府和媒体的关注^[5-6]。间斑寇蛛毒腺分泌的毒液的毒性主要由其蛋白质成分所致^[7-8]。已证明其毒液中包含几种分子量较大的寇蛛属蜘蛛代表性蛋白质毒素-latrotoxins (LTX)。它们选择性作用于脊椎动物、昆虫和甲壳类动物等不同类型的动物。在过去几十年里，从寇蛛属蜘蛛毒液中至少分离出了7种不同的latrotoxins。它们都是分子量范围在110–130 kDa的酸性蛋白质，pI范围为5.0–6.0。其中大多数以昆虫（蜘蛛的天然猎物）为作用对象。其中，有关 α -latrotoxin的研究最为深入^[9-11]。Latrotoxins被广泛用于研究脊椎动物、昆虫和甲壳类动物神经分泌的分子机制。Latrotoxins特别是 α -latrotoxin的结构和功能分析中取得的进展从根本上加深了我们对这些毒素复杂作用机制的了解并使我们获得了关于神经递质释放调节机制的重要信息。

Ushkaryov等^[11-12]和Rohou等^[13]对此进行了综述。本文将着重概述间斑寇蛛毒素蛋白质化学与蛋白质组学研究的最新进展。

1 毒腺毒液的蛋白质组成及其与毒腺毒性的关系

与虎纹捕鸟蛛 *Selenocosmia huwena*^[14]等许多其他有毒动物不同，间斑寇蛛毒腺分泌的毒液的毒性成分主要是蛋白质^[7-8]。分析鉴定毒液的蛋白质组成有助于揭示毒液毒性的分子基础和作用机制。现代蛋白质组学技术的发展与应用为蜘蛛毒素蛋白的分析鉴定提供了有利条件，尤其是高灵敏度生物质谱仪的应用使微量毒素样品的蛋白质组学分析成为可能。

间斑寇蛛体型较小，毒素的采集不易，样品来源不足是深入开展相关研究的瓶颈之一。寇蛛毒素研究中，解剖分离蜘蛛毒囊后提取毒素是早期研究常用的方法^[15-17]，因该方法操作简单，可一次性将毒囊中的毒素全部取出。此外，在室内人工饲养条件下，间斑寇蛛成年蜘蛛平时有一定比例的个体陆续死亡，且一般都会在越冬前死去，在成蛛死亡前及时分离其毒腺提取毒素可最大限度地利用毒素资源。为了扩大毒素来源，笔者所在的研究室进行了间斑寇蛛的室内人工饲养研究，对影响间斑寇蛛室

内生长发育的因素如温度、湿度和饲料成分等进行了较为系统地探索,使间斑寇蛛的室内饲养获得成功并对采毒方法进行了探讨^[18-19]。采用分离毒囊提取毒素的方式获得了间斑寇蛛的毒腺毒素样品,并对其进行了生物学特性^[20]和蛋白质组学分析^[21]。进行蛋白质组学分析时,鉴于样品蛋白质组成的复杂性,采用了综合蛋白质组学技术策略,以利用不同策略鉴定结果的互补性,获得覆盖率和准确性更高的鉴定结果。采用的技术策略主要包括 SDS/PAGE-MS/MS、2D-PAGE-MS/MS 和 Shotgun-MS/MS。在利用 Shotgun-MS/MS 策略时,液-质联用分析前对 shotgun 方法消化的样品进行了分级分离,以降低样品的复杂程度,提高蛋白质的鉴定效果。此外,为提高蛋白质鉴定的准确性,对采用未解析 MS/MS 数据检索获得的部分鉴定结果再次采用序列检索法进行了进一步的验证。通过跨库检索,共从样品中鉴定出 86 个非冗余蛋白质。鉴定的蛋白质中,除了文献已报道的几种代表性寇蛛毒素 Latrotoxins 外,还鉴定出其他多种酶类和特异蛋白质,如溶菌酶、蛋白酶、磷脂酶和抑制蛋白等,推测这些蛋白质也在间斑寇蛛粗毒的毒性中起重要的作用,因为蜘蛛粗毒的某些酶类尤其是蛋白酶已被实验证明参与毒素的毒性作用^[22-23]。

利用解剖分离蜘蛛毒腺提取毒素的方法虽然简单易行,但不可避免地使样品遭受部分组织蛋白的污染,同时也不利于重复利用宝贵的蜘蛛毒素资源。利用电刺激活体采毒法从蜘蛛毒腺采集毒液则可避免这些不足,不仅可以获得没有污染因而更具代表性的纯净毒液,而且每隔 10-15 天便可重复采毒一次,从而可最大限度地利用宝贵的毒素资源^[18]。本实验室经过

系列探索,建立了适用于间斑寇蛛活体采毒的电刺激采毒法,并用前述类似的方法对电刺激法采集的毒液进行了生理生化^[8]和蛋白质组学分析^[24]。结果显示,毒液中的蛋白质主要分布在分子量 60 kDa 以上和 43 kDa 左右的范围,丰度最高的蛋白质分布在 100 kDa 左右。从中鉴定出 122 种非冗余蛋白质。生物信息学分析表明,其中 75 种蛋白质具有明确的生物学功能;47 种为预测或假定的蛋白质或功能完全未知的蛋白质。在鉴定的 122 种蛋白质中,10 种蛋白质(占 8.2%)为文献报道过的寇蛛毒素或其前体分子;13 种(占 10.7%)具有水解酶活性,包括蛋白酶和磷脂酶等,另有 20 种蛋白质(占 16.4%)具有加单氧酶等其他酶活性,说明间斑寇蛛毒液富含代谢酶类;23 种鉴定蛋白质(占 18.9%)具有结合功能,它们能与其他蛋白质、核酸或 ATP 等结合而发挥生物学作用,提示这些蛋白质具有功能上的多样性。具有其他功能的蛋白质 31 种(占 25.4%),包括结构蛋白、离子通道蛋白和酶抑制剂等;有 25 种蛋白质的功能完全未知,数据库中缺乏相关信息,有待进一步深入研究。值得一提的是,采用综合蛋白质组学分析策略,从间斑寇蛛毒液中鉴定到几乎所有文献报道的代表性寇蛛毒素,说明采用综合性组学分析策略获得的鉴定结果具有较高的可靠性。

鉴于不同方法采集的毒素样品组成上存在差别,Duan 等^[25]对电刺激方法采集的粗毒与用传统的解剖毒腺的方法采集的粗毒进行了比较分析。结果显示,两种方法获得的粗毒样品中的蛋白质成分主要都是分子量较大(>10 kDa)的酸性蛋白,分子量<10 kDa 的蛋白质和多肽较少。与解剖毒囊的粗毒相比,电刺激粗毒含有

较少的大分子量 (>10 kDa) 蛋白质, 而分子量较小 (<10 kDa) 的蛋白质和多肽的组成非常相似, 且主要分布在 6–8 kDa 的范围内。腹腔注射昆明种小白鼠后, 两种方法采集的粗毒引起的中毒症状相同。电刺激粗毒和毒囊粗毒的 LD₅₀ 分别为 0.16 mg/kg 和 0.39 mg/kg。粗毒的哺乳动物神经毒性主要基于其中的大分子量酸性蛋白成分而不是低分子量的多肽。总的说来, 电刺激粗毒中的活性成分与毒囊粗毒中的相似, 但含量高于毒囊粗毒。

2 毒腺转录组分析鉴定毒液的蛋白质组成

尽管间斑寇蛛的毒腺毒素已得到了较为广泛的研究, 但由于有关基因组和转录组的资料有限, 从而限制了我们对毒腺毒液分子组成的深入了解。He 等^[26]综合利用第二代测序技术和传统的 cDNA 文库测序技术构建了间斑寇蛛毒腺的转录组, 分别从 34 334 个从头测定序列和 1 024 个 cDNA 序列中鉴定了 9 666 个和 480 个高置信度的蛋白质。对这些蛋白质的功能进行深入分析后发现, 毒腺富含与 RNA 转运和剪接、蛋白质翻译、加工和运输有关的 mRNA 分子, 该特性是与毒腺产生蛋白质毒素这一特殊功能一致的。总共鉴定到 146 个毒素样蛋白质包括 6 种已知的代表性寇蛛毒素蛋白, 可分成 12 家族, 包括 6 个新家族, 其中 α -LTX-Lt1a 家族 2 首次被鉴定为 α -LTX-Lt1a 家族的亚家族。根据其生物学活性可将鉴定的这些毒素蛋白分成能以协同方式发挥作用的 5 组: 神经毒素、辅助毒素、蛋白酶、蛋白酶抑制剂和功能未知的毒素。神经毒素作为蜘蛛主要的武器特异性作用于神经系统, 杀死猎物或使之瘫痪; 辅助毒素通过促进神经毒素与靶标的结合而增强神经毒素的作

用; 蛋白酶抑制剂可保护神经毒素和辅助毒素免遭蛋白酶降解; 蛋白酶能裂解毒素前体使之成为有活性的成熟毒素, 或帮助消化和利用猎物。未鉴定到离子通道, 提示蜘蛛不表达毒素的作用靶标可能是蜘蛛免受自身毒素攻击的一种可能的自我保护机制。该转录组数据库是目前最大的蜘蛛毒腺转录组或毒素组数据库, 它使我们加深了对间斑寇蛛毒腺毒液蛋白质组成复杂性及其产生和作用方式等的了解。

3 毒腺外蛋白质类毒素的分析鉴定

与其他有毒动物不同, 间斑寇蛛的有毒成分不仅存在于毒腺中, 而且还存在于身体的其他部位如腿和腹部组织, 甚至卵粒和幼株体内也存在毒性成分^[27-28]。研究间斑寇蛛毒腺外材料中的毒素成分, 探讨其与毒腺毒素的异同和生物学作用等具有重要的理论和实际意义, 不仅可以帮助我们了解相关的毒性机制, 而且能够扩大蜘蛛毒素的研究领域, 为毒素资源的开发利用筛选新的前体分子。

间斑寇蛛雌蛛大约在每年 6 月至 10 月间编织卵囊产卵。卵囊为黄褐色, 卵囊内卵粒呈黄色^[29]。卵粒中为什么产生毒素, 其与毒腺毒素的可能关系和异同等都是十分有趣的问题。我们的分析结果表明, 卵粒富含高分子量的蛋白质和分子量 5 kDa 以下的多肽, 5 kDa 至 10 kDa 的蛋白质和多肽较少。蛋白质分布在较宽的分子量和等电点范围内, 说明卵粒的蛋白质组成具有较高的复杂性。卵粒提取物能完全阻断小鼠膈神经-膈肌标本内的神经肌肉传导, 提示卵粒含有多种神经毒性成分, 且这种阻断作用被证明主要由卵粒中的高分子量蛋白质所致。酶学分析证明间斑寇蛛卵粒显示多种水解酶活

性, 包括透明质酸酶、乙酰胆碱酯酶、酸性磷酸酶、碱性磷酸酶、蛋白水解酶等。实验结果证明, 卵粒中多种神经毒性成分和其他活性成分的存在构成了卵粒毒性的分子基础。为了进一步探究卵粒蛋白与卵粒毒性作用的可能关系及其与间斑寇蛛毒腺毒素的关系与异同, Li 等^[30]综合运用基于凝胶电泳和 shotgun 分析的蛋白质组学策略, 对卵粒蛋白质组进行了分析鉴定和生物信息学分析, 并与间斑寇蛛的毒腺毒液蛋白质组进行了比较。SDS-PAGE 分析显示间斑寇蛛卵粒蛋白主要分布在分子量大于 60 kDa 以及 34 kDa 附近的区域, 在 170 kDa 附近具有较多的高丰度蛋白质。通过 CapLC-MS/MS 分析和蛋白质数据库检索从卵粒提取物中共鉴定到 157 个非冗余蛋白。生物信息学分析表明, 这些卵粒蛋白参与许多重要的细胞功能和代谢过程, 包括催化作用、转运作用、新陈代谢调控等。其中, 63 个蛋白质 (约 40.1%) 具有酶活性, 包括蛋白酶、磷脂酶、磷酸酶、核酸酶和其他代谢酶类, 说明卵粒富含酶类蛋白质。44 个蛋白质 (约占 28.0%) 具有结合功能。它们能与 ATP、核酸、蛋白质/受体、脂类和/或金属离子等结合, 提示它们在多种物质和能量代谢过程中起重要作用。其他一些鉴定的蛋白质起着转运、信号传导和结构分子活性的作用。此外还鉴定到 14 种功能未知的蛋白质。通过比较发现, 卵粒的蛋白质组成比毒腺毒液的蛋白质组成更为复杂, 它们之间的相似性很小。与毒腺毒液蛋白质组学分析结果相比, 从卵粒中鉴定到更多的酶和具有结合功能的蛋白质, 但没有从卵粒中鉴定到寇蛛毒腺毒液中的典型寇蛛毒素蛋白 latrotoxins 和其他已知的毒液蛋白类毒素成分, 说明卵粒具有与毒腺毒液不同的蛋白质组

成和独特的毒性机制。此外, 鉴于间斑寇蛛卵粒反复匀浆和水提取后剩余的沉淀主要是卵粒的细胞膜, 它们是构成间斑寇蛛卵粒不可缺少的重要组成部分, Li^[31]还运用去垢剂辅助的方法对卵粒膜蛋白进行了提取、SDS-PAGE 分离和基于液-质联用技术的蛋白质组学分析。SDS-PAGE 分析表明, 卵壳膜蛋白主要分布在 34 kDa 附近以及 60 kDa 以上的区域, 与卵粒可溶性蛋白的分布相比, 卵壳膜蛋白主要分布在高分子量区域, 30 kDa 以下区域的蛋白质条带较少。从卵壳提取物中共鉴定到 26 个蛋白质, 包括多种酶和具有结合功能的蛋白质。生物信息学分析表明, 多数鉴定的蛋白质都是推断的或功能未知的蛋白, 提示间斑寇蛛的卵粒壳膜蛋白的组成和性质具有其特殊性。

为了更为详细地研究间斑寇蛛卵粒中的活性蛋白, 我们在研究中综合运用多种生物化学技术对卵粒中的蛋白质成分进行了分离纯化和结构与性质分析。Li 等^[32-33]利用分子筛层析、离子交换层析以及反相高效液相色谱层析相结合的方法从卵粒提取物中分离纯化出两种活性蛋白, 分别命名为 Latroeggtxin-I 和 Latroeggtxin-II。电喷雾质谱测定它们的分子量分别为 23.752 kDa 和 28.690 kDa。腹腔注射时 Latroeggtxin-I 能使小鼠产生一系列中毒症状。电生理实验表明, 该蛋白质能以可逆的方式完全阻断离体小鼠膈神经-膈肌标本的神经肌肉传导, 提示该蛋白具有较强的哺乳动物毒性。Edman 降解法测得该蛋白质 N-末端序列为 N-S-I-A-D-D-R-Y-R-W-P-G-Y-P-G-A-G-L-I-P-Y-I-I-D-S—。Latroeggtxin-II 的 N-末端序列为 E-S-I-Q-T-S-T-Y-V-P-N-T-P-N-Q-K-F-D-Y-E-V-G-K-D-Y—。将 Latroeggtxin-II 通过腹腔注射小鼠和蜚蠊, 可以使实验动物特别是蜚蠊显示一

系列中毒症状,包括精神萎靡、运动迟缓和对外界刺激反应迟钝等。膜片钳实验结果表明,Latroeggtxin-II能特异性抑制大鼠背根神经节细胞的TTX-R型 Na^+ 离子通道,抑制作用具有剂量效应,而对TTX-S型 Na^+ 通道无明显作用。鉴于背根神经节细胞表达的TTX-R型钠通道(即Nav1.8和Nav1.9)在疼痛信号传递中起关键作用,Latroeggtxin-II与TTX-R型钠通道的相互作用可能改变疼痛传入神经元的兴奋性,进而改变外周疼痛感受,从而在疼痛研究及相关药物的研发中显示一定的应用前景。利用测得的N-端序列运用Mascot序列搜寻引擎搜索蛋白质数据库的结果表明,蛋白质数据库中没有与Latroeggtxin-I和-II匹配的蛋白质。同时,BLAST分析也没有发现完全相同的蛋白质。这些结果证明,这两种蛋白质都是首次从间斑寇蛛卵粒中分离纯化出的新型毒性蛋白。

间斑寇蛛一般以幼蛛或卵粒的形式在卵囊中越冬。很早的时候就发现间斑寇蛛幼蛛体内亦存在毒性成分^[27-28]。为了探究幼蛛毒性的分子基础及其与卵粒和毒腺毒性的关系,Peng等^[34]对新生幼蛛的提取物进行了较为系统的生理生化分析并将其与卵粒提取物进行了比较。结果表明,幼蛛提取物的蛋白质含量为69.42%,高于卵粒提取物。腹腔注射可引起小鼠和蜚蠊明显的中毒症状乃至死亡,对小鼠的 LD_{50} 值为5.30 mg/kg,说明幼蛛的毒性低于卵粒。电生理实验显示,幼蛛提取物能够完全阻断小鼠膈神经-膈肌标本内的神经肌肉传导,提示幼蛛体内含有多种哺乳动物神经毒活性成分。全细胞膜片钳分析实验发现,幼蛛提取物能有效抑制大鼠背根神经节细胞的电压门控 Na^+ 、 K^+ 和 Ca^{2+} 通道电流,说明幼蛛含有丰富的能作用于神经细胞离子通道的活性成分。凝胶电泳显示,间

斑寇蛛幼蛛的蛋白质组成与卵粒的非常相似,主要差异表现在低丰度蛋白质不同,提示幼蛛的毒性机制与卵粒的相似而与毒腺的具有较大差异;同时也说明新生幼蛛保留了大多数卵粒蛋白,低丰度蛋白质(包括原有的和新合成的)在卵粒发育成幼蛛的过程中起重要作用。此外,还对幼蛛的蛋白质组进行了初步分析,一次性鉴定到36个非冗余蛋白,包括结构蛋白和与催化、物质转运、蛋白质加工、免疫等功能相关的蛋白质。另鉴定到一些功能未知的蛋白质。

4 结论与展望

间斑寇蛛是一种较为奇特的蜘蛛,不仅因为它是世界上目前已知毒性最强的蜘蛛之一,而且因为它与一般的有毒动物不同,不仅毒腺中合成和分泌毒素,而且其身体的其他组织器官甚至其幼蛛和卵粒中也产生毒性成分。研究这些毒性成分及其他活性成分的性质、结构和可能的相互关系及生物进化上的意义,不仅可以拓展我们对蜘蛛毒素的了解,而且可以为开发医药、高效生物杀虫剂及神经生物学和神经药理学研究的工具试剂筛选新型先导分子。到目前为止,尽管已对间斑寇蛛蛋白质类毒素进行了一些研究,并分离纯化出多种蛋白质和多肽毒素并对其结构与功能进行了分析与鉴定,甚至有一些latrotoxins已被成功开发成工具试剂并在神经生物学研究中发挥了重要作用,但总的来看,由于缺乏专门的蜘蛛基因组数据库,从而给蜘蛛蛋白质类毒素的分析鉴定带来一定的困难;间斑寇蛛毒素尤其是毒腺外材料来源毒素的研究还有待进一步深入,需要在数据库的构建和蛋白质类毒性成分的分离纯化及结构与功能研究方面加大投入。此外,鉴于天然毒

素来源有限, 必须加强活性蛋白类成分分子生物学表达研究, 以获得足够的样品供详细的结构-功能关系及开发应用研究之用。

REFERENCES

- [1] Zhu MS. The spiders of China Arachnida Araneae Theridiidae. Beijing: Science Press, 1998: 293–294 (in Chinese).
朱明生编著. 中国动物志·蛛形纲·蜘蛛目·球蛛科. 北京: 科学出版社, 1998, 293–294.
- [2] Bonnet MS. The toxicology of *Latrodectus tredecimguttatus*: the Mediterranean black widow spider. Homeopathy, 2004, 93: 27–33.
- [3] Afshari R, Khadem-Rezaiyan M, Balali-Mood M. Spider bite (latrodectism) in Mashhad, Iran. Hum Exp Toxicol, 2009, 28(11): 697–702.
- [4] Calista D, Venturelli C, Morri M. *Latrodectus tredecimguttatus* spider bite. Br J Dermatol, 2004, 151(2): 505.
- [5] Lu DL, Zhang DF. Two varieties of highly poisonous spiders in Xinjiang and the prevention and cure of their bite. Chin J Zool, 2001, 36(5): 40–42 (in Chinese).
陆东林, 张丹凤. 新疆两种剧毒蜘蛛及其咬伤防治. 动物学杂志, 2001, 36(5): 40–42.
- [6] Lian LH, Wang GH. First aid and nursing for 14 cases of black spider bites, J Chin Prac Med, 2001, 2001, 3(15): 86 (in Chinese).
连立红, 王桂花. 14例黑蜘蛛咬伤急救与护理. 中华实用医学, 2001, 3(15): 86.
- [7] Tu AT. Spider venoms. In: Tu AT(ed) Venoms: Chemistry and Molecular Biology. New York: John Wiley & Sons Press, 1977: 484–500.
- [8] Wang XC, Duan ZG, Yang J, et al. Physiological and biochemical analysis of *L. tredecimguttatus* venom collected by electrical stimulation. J Physiol Biochem, 2007, 63(3): 221–230.
- [9] Garb JE, Hayashi CY. Molecular evolution of α -latrotoxin, the exceptionally potent vertebrate neurotoxin in black widow spider venom. Mol Biol Evol, 2013, 30(5): 999–1014.
- [10] Mesngon M, McNutt P. Alpha-latrotoxin rescues SNAP-25 from BoNT/A-mediated proteolysis in embryonic stem cell-derived neurons. Toxins (Basel), 2011, 3(5): 489–503.
- [11] Ushkaryov YA, Rohou A, Sugita S. α -Latrotoxin and its receptors. Handb Exp Pharmacol, 2008, 184: 171–206.
- [12] Ushkaryov YA, Volynski KE, Ashton AC. The multiple actions of black widow spider toxins and their selective use in neurosecretion studies. Toxicon, 2004, 43: 527–542.
- [13] Rohou A, Nield J, Ushkaryov YA. Insecticidal toxins from black widow spider venom. Toxicon, 2007, 49(4/5): 531–549.
- [14] Liang S. An overview of peptide toxins from the venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwena* Wang [= *Ornithoctonus huwena* (Wang)]. Toxicon, 2004, 43(43): 575–585.
- [15] Frontali N, Ceccarelli B, Gorio A, et al. Purification from black widow spider venom of a protein factor causing the depletion of synaptic vesicles at neuromuscular junctions. J Cell Biol, 1976, 68(3): 462–479.
- [16] Gorio A, Mauro A. Reversibility and mode of action of black widow spider venom on the vertebrate neuromuscular junction. J Gen Physiol, 1979, 73(2): 245–263.
- [17] Misler S, Hurlbut WP. Action of black widow spider venom on quantized release of acetylcholine at the frog neuromuscular junction: dependence upon external Mg^{2+} . Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76(2): 991–995.
- [18] Zhou H, He XZ, Duan ZG, et al. On methods for indoor rearing *L. tredecimguttatus* and collecting venom from the live spider. Acta Arachnol Sin, 2005, 14(1): 58–63 (in Chinese).
周红, 何小珍, 段志贵, 等. 间斑寇蛛 (*L. tredecimguttatus*) 室内饲养及活体采毒方法的初步探讨. 蛛形学报, 2005, 14(1): 58–63.
- [19] Duan ZG, Yan XJ, Deng XC, et al. Overwintering and early rearing of *Latrodectus tredecimguttatus*

- baby spiders. *Chin J Ecol*, 2007, 26(3): 363–367 (in Chinese).
段志贵, 晏晓军, 邓星灿, 等. 间斑寇蛛幼蛛过冬及其早期饲养管理. *生态学杂志*, 2007, 26(3): 363–367.
- [20] Yang J, Duan ZG, Zhou H, et al. Biological characterization of venom from spider *Latrodectus tredecimguttatus*. *Acta Zool Sin*, 2007, 53(4): 682–688 (in Chinese).
杨静, 段志贵, 周红, 等. 间斑寇蛛粗毒的生物学特性. *动物学报*, 2007, 53(4): 682–688.
- [21] Duan ZG, Yan XJ, He XZ, et al. Extraction and protein component analysis of venom from the dissected venom glands of *Latrodectus tredecimguttatus*. *Comp Biochem Physiol, Part B*, 2006, 145(3/4): 350–357.
- [22] Futrell JM. Loxoscelism. *Am J Med Sci*, 1992, 304: 261–267.
- [23] Rash LD, Hodgson WC. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. *Toxicon*, 2002, 40: 225–254.
- [24] Duan ZG, Yan XJ, Cao R, et al. Proteomic analysis of *Latrodectus tredecimguttatus* venom for uncovering potential latrodectism-related proteins. *J Biochem Mol Toxicol*, 2008, 22(5): 328–336.
- [25] Duan ZG, Yang J, Yan XJ, et al. Venom properties of the spider *Latrodectus tredecimguttatus* and comparison of two venom-collecting methods. *Zool Res*, 2009, 30(4): 381–388 (in Chinese).
段志贵, 杨静, 晏晓军, 等. 间斑寇蛛粗毒液的生理生化分析及两种采毒方法的比较. *动物学研究*, 2009, 30(4): 381–388.
- [26] He QZ, Duan ZG, Yu Y, et al. The venom gland transcriptome of *Latrodectus tredecimguttatus* revealed by deep sequencing and cDNA library analysis. *PLoS ONE*, 2013, 8(11): e81357.
- [27] Kobert R. Ueber die giftigen spinnen russlads. *Sber Naturf Ges Dorpot*, 1889, 8: 340–362.
- [28] Akhunov AA, Golubenko Z, Abdurashidova NA, et al. Comparative biochemistry of the physiologically active components of venom, hemolymph, and eggs of the karakurt spider (*Latrodectus tredecimguttatus*). *Chem Nat Compd*, 2001, 37(6): 562–565.
- [29] Levy G. *Fauna Palaestina. Arachnida III-Araneae: Theridiidae*. Jerusalem: Graphit Press, 1998: 85–97.
- [30] Li J, Liu H, Duan Z, et al. Protein compositional analysis of the eggs of black widow spider (*L. tredecimguttatus*): implications for the understanding of egg toxicity. *J Biochem Mol Toxicol*, 2012, 26(12): 510–515.
- [31] Li JJ. *Biochemical research on proteins from the eggs of the spider L. tredecimguttatus*[D]. Changsha: Hunan Normal University, 2013 (in Chinese).
李建军. 间斑寇蛛卵粒蛋白的生物化学研究[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2013.
- [32] Li JJ, Yan YZ, Wang JR, et al. Purification and partial characterization of a novel neurotoxic protein from eggs of black widow spiders (*Latrodectus tredecimguttatus*). *J Biochem Mol Toxicol*, 2013, 27(7): 337–342.
- [33] LI JJ, Yan YZ, Yu H, et al. Isolation and identification of a sodium channel-inhibiting protein from eggs of black widow spiders. *Int J Biol Macromol*, 2014, 65: 115–120.
- [34] Peng XZ, Zhang YY, Liu JY, et al. Physiological and biochemical analysis to reveal the molecular basis for black widow spiderling toxicity. *J Biochem Mol Toxicol*, 2014, 28(5): 198–205.

(本文责编 郝丽芳)