

膜片钳技术在昆虫毒素作用机理研究中的应用

王瑞兰 (广东食品药品职业学院食品学院, 广东广州 510520)

摘要 在介绍膜片钳技术和离子通道的作用的基础上, 综述了膜片钳技术在杀虫作用机理(昆虫 Na^+ 通道毒素)及新型安全生物杀虫剂研发中的应用, 为新型安全生物杀虫剂的研发提供了参考。

关键词 膜片钳技术; 昆虫毒素; 生物杀虫剂; 应用

中图分类号 S476 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)05-01948-04

Application of Patch-clamp Technique in Insect Toxin Action Mechanism

WANG Rui-lan (Department of Food Science, Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou, Guangdong 510520)

Abstract On the basis of introducing the function of patch-clamp technique and ion channel, the insecticide action mechanism (insect Na^+ channel toxin) was reviewed, as well as its application in new type safety insecticides development, which can provide reference for the research and development of insecticides.

Key words Patch-clamp techniques; Insect toxins; Insecticides; Application

虫害是世界各国农业生产面临的重大问题, 全世界每年因虫害造成的损失逾 2 000 亿美元。目前, 控制虫害的主要方法是使用化学农药, 而化学农药的残留严重危害人畜健康和污染环境。寻找新型安全的生物杀虫剂不仅是农业发展迫切需要解决的问题, 也是保障人类生命安全和保护环境的必要措施。新型安全生物杀虫剂的研发目标是探索发现对人类、牲畜以及非靶标昆虫安全无害的材料。蝎、蜘蛛、蛇、海葵、河豚等有毒动物在长期进化过程中在体内形成了一类对猎物高选择性、高特异性的毒素。膜片钳技术是以细胞膜上的离子通道为研究对象的现代电生理研究方法。电压门控 Na^+ 通道在昆虫神经系统电生理过程中起着非常重要的作用。昆虫 Na^+ 通道是许多动植物神经毒素特异作用的靶受体。膜片钳技术自发展以来, 在生物杀虫剂作用机理的研究与生物杀虫剂的研发中发挥了巨大作用。笔者综述了膜片钳技术在杀虫作用机理及新型安全生物杀虫剂研发中的应用, 旨在为新型安全生物杀虫剂的研发提供参考。

1 膜片钳技术

膜片钳技术是在电压钳基础上发展起来的一种反映细胞膜上单一(或多数的)离子通道活动的新技术。它利用负反馈电子线路, 将微电极尖端所吸附的细胞膜电位固定在一定水平, 观察离子通道的电流。1976 年德国马普生物物理化学研究所的 Neher 和 Sakamann 首次报道了应用膜片钳技术记录蛙胸皮肌细胞膜上离子通道的离子电流^[1]。

膜片钳技术有不同的记录方法, 如细胞吸附式、外面向外模式和内面向外模式、全细胞模式等^[2]。细胞吸附式、外面向外模式和内面向外模式又称为单通道记录技术, 它们能记录到细胞膜上单个离子通道开放时产生的电流, 便于观察它们的动力学特征。而全细胞模式记录的是整个细胞膜上全部通道的电流, 是 4 种模式中应用最广泛的一种, 可反映细胞膜上群体通道的特征, 如逆转电位、稳态失活、通道失活

恢复速率等, 尤其是可用于分析多数培养细胞和急性分离细胞的生理特性, 有助于研究通道的电导、动力学、药理学特征以及通道的调节机制。

膜片钳技术可直接区分细胞离子通道的离子选择性, 还可研究某些药物或毒素对离子通道开闭及通道电流的影响, 并能对其电生理特性、分子结构及药物或毒素影响人和动物生理功能的分子作用机理等进行深入研究。近 20 年来, 膜片钳在离子通道和毒素的相关研究上取得了较快发展。

2 离子通道的作用

离子通道是镶嵌在细胞膜脂质双层上的一类结构类似管道的跨膜蛋白质, 是生物电生理活动的基础, 在细胞内和细胞间信号传递中起着重要作用^[3]。离子通道可分为电压门控离子通道、配体门控离子通道、环核苷酸门控离子通道和机械门控离子通道。大多数动物离子通道毒素只作用于电压门控离子通道。电压门控离子通道在形成神经和肌细胞的电活动过程中在控制神经递质和激素分泌方面起关键作用, 因此, 维持离子通道的结构和功能正常是维持生命过程的基础。

电压门控 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 离子通道的开放与关闭对于神经元和其他可兴奋细胞在产生可传导电信号的过程中起着重要作用。动作电位是可兴奋性细胞或组织进行信号传导的主要方式, Na^+ 通道在动作电位的起始阶段控制着动作电位的去极化。 K^+ 通道在去极化相完成之后才开放, 控制着动作电位的复极化相, 消除细胞膜因 Na^+ 通道开放引起的去极化电位, 并使细胞膜电位恢复至原有的静息水平。因此, 从根本上来说, Na^+ 通道是动作电位的基础与关键因素, 其活动直接决定了动作电位是否产生与爆发^[4-5], 在生物的生理活动中起着关键作用。

3 昆虫 Na^+ 通道毒素

电压门控 Na^+ 通道广泛分布在生物兴奋组织细胞中, 是许多动植物神经毒素及药物特异作用的靶受体。目前已有 10 种哺乳动物电压门控 Na^+ 通道亚型 ($\text{Nav}1.1 \sim 1.9$ 和 $\text{Na}_v x$) 和 3 种昆虫 Na^+ 通道亚型(如 para/tipE 等)被成功进行了基因克隆和体外表达^[6-8]。虽然它们在电生理学、一级

结构及功能域的分配上类似,但昆虫 Na^+ 通道的药理学特性与哺乳动物有明显区别。自然界许多有毒动物,如蝎、蜘蛛等分泌的毒素是一个巨大的天然资源库,包含自然选择结果产生的对昆虫和哺乳动物选择性作用的多肽毒素,高度选择性和专一性地作用于各自靶蛋白的电压门控 Na^+ 通道^[9-12]。许多对昆虫具有较强毒性的多肽毒素对哺乳动物无毒或毒性很小,而且与传统农药相比,它们进入土壤后易彻底变性分解,不会遗留而污染自然环境,这些特性是其成为新型安全生物杀虫剂候选者的重要条件。

通过膜片钳技术研究发现,这些毒素通过结合在 Na^+ 通道的不同位置引起通道的动力学特征发生相应改变,如阻塞通道口、通道去失活、失活延缓、易化激活等^[13],通过调节 Na^+ 通道的各种功能活性,进而影响电信号过程,导致昆虫麻痹甚至死亡^[14-15]。神经元 Na^+ 通道上有 7 个毒素结合部位,Cestele 等^[16]将这 7 个部位依次命名为位点 1~位点 7,而与之结合的毒素则相应称为位点 1 毒素~位点 7 毒素。

3.1 蜘蛛昆虫 Na^+ 通道毒素 目前,从蜘蛛的毒液中已分离鉴定出多种专一性调节昆虫电压门控 Na^+ 通道的多肽神经毒素,主要和 Na^+ 通道的 3 个位点结合,分别是:作用于通道位点 1,阻断通道口;作用于位点 3,延缓通道失活相;作用于位点 4,抑制通道激活^[17]。

3.1.1 位点 1 毒素。来自海南捕鸟蛛(*Selenocosmia hainana*)的 HNTX-I 是第 1 个被发现的昆虫选择性位点 1 毒素,对昆虫 Na^+ 通道 para/tiPE 亚型的选择性比大鼠 Nav 1.2/pI 的选择性高 1.5 倍,但对其他 Na^+ 通道亚型无明显影响^[18]。

从我国虎纹捕鸟蛛(*Ornithoctonus huwena*)粗毒中分离纯化到的 HWTX-III 也是选择性作用于昆虫 Na^+ 通道位点 1 的神经多肽毒素,采用全细胞膜片钳技术研究表明,其以类似于河豚毒素的方式阻断美洲蜚蠊的背侧不成对中间(DUM)神经细胞的电压门控 Na^+ 通道,但不影响通道的激活与失活动力学,不明显的漂移稳态失活曲线表明它以不同于其他抑制型蜘蛛毒素的方式作用于位点 1^[19-20]。

3.1.2 位点 3 毒素。由南美洲“武装”蜘蛛黑腹栉足蛛 [*Phoneutria nigriventer* (Araneomorphae: Ctenidae)] 毒液中分离纯化到的毒素 Tx4(6-1)是一种 Na^+ 通道位点 3 昆虫选择性毒素^[21]。它对不同种类昆虫均有毒性,采用膜片钳技术研究发现其能延缓 Na^+ 通道的失活,延长动作电位,但不改变电压依赖激活或失活特性。它对哺乳动物无毒性,对表达在卵母细胞上的 Nav1.2 和 Nav1.4 通道门控和动力学也无影响。

采用全细胞膜片钳技术研究表明,从海南捕鸟蛛(*Ornithoctonus hainana*)粗毒中分离到的神经毒素 HNTX-VI 能以类似于 δ -atracotoxins^[22]方式作用于蜚蠊 DUM 神经细胞的 Na^+ 通道位点 3,延缓 Na^+ 通道的失活,导致 Na^+ 通道稳态失活变得不完全^[20,23],类似于 δ -ACTX-Hv1a^[24],但不同于 Tx4(6-1)^[21]。

从巨型上户蛛(*M. gigas*)中分离的 Magi 2、从 *Hexathelidae* spider *Macrothele gigas* 分离到的 5 种毒素 Magi 1~5^[25]也

选择性地作用于昆虫 Na^+ 通道位点 3,致昆虫瘫痪,但缺乏对哺乳动物的毒性。

3.1.3 位点 4 毒素。来自蜘蛛(*Aracoeolotes luctuosus*)的多肽 δ -PaluITs 是第 1 个通过膜片钳技术发现的选择性结合在昆虫 Na^+ 通道位点 4 的毒素,调节 Na^+ 通道的失活过程^[26-27],在浓度高达 10 $\mu\text{mol/L}$ 时对脊椎动物 Na^+ 通道均无影响^[28]。

μ -agatoxins 和 Curtatoxins 是分别来自蜘蛛 *Agelenopsis aperta* 和 *Hololena curta* 的毒素,膜片钳技术表明它们都特异性作用于昆虫 Na^+ 通道位点 4,影响神经元的电压激活 Na^+ 通道,引起电压依赖性激活向超极化方向漂移,诱导神经重复性激活,释放大递质,使昆虫缓慢地、不可逆地麻痹。 μ -agatoxins 还能引起兴奋和自发的递质释放,也能通过协同作用增强 α -agatoxins 的毒性^[29]。 μ -Aga-IV 已被融入到一种设计的杆状病毒中,作为一种具有更高杀虫速度的新杀虫剂来估计其价值。

3.1.4 无明确鉴定位点的毒素。虽然许多蜘蛛毒素的作用位点已知,但还有许多蜘蛛毒素的作用位点仍未确定。一个 56~61 个氨基酸残基组成的昆虫毒素家族 DTX9.2、11 和 12 来自原始的织网蜘蛛 [*Diguentiacanities* (Araneomorphae: Diguentidae)]。这些昆虫选择性神经毒素引起烟草蚜虫幼虫进行性痉挛性麻痹,对小鼠腹腔、脑室注射该毒素无明显影响。DTX9.2 引起家蝇幼虫神经肌肉和感觉神经标本的兴奋性突触后电位重复发放及蜚蠊巨型轴突的膜电位去极化。所有的这些影响都可被特异的 Na^+ 通道阻断剂——河豚毒素逆转,表明 DTX9.2 作用在昆虫神经元的电压依赖性 Na^+ 通道上^[30],但具体的作用位点需通过膜片钳技术进一步研究。

3.2 蝎昆虫 Na^+ 通道毒素 蝎毒素是蝎子在长期进化过程中形成的捕食猎物和防御天敌的有利武器,含有丰富的可作用于各种离子通道的多肽类神经毒素,其中以 Na^+ 通道毒素含量最高,对不同猎物的 Na^+ 通道表现出很强的选择性。对昆虫 Na^+ 通道显示高度选择性的蝎毒素被称为“杀虫剂蝎毒素”^[31]。以受体位点及电生理作用为分类依据,蝎昆虫毒素分为 4 类:兴奋型、抑制型、 α -型和 β -型。在抗昆虫蝎毒素中,对哺乳动物和昆虫都有毒性的毒素也有存在,但其对昆虫的毒性远大于对哺乳动物,也有的兼具 α -型和 β -型的特征^[32-33]。

3.2.1 兴奋型昆虫毒素。采用膜片钳技术研究表明,该类毒素特异性作用于昆虫 Na^+ 通道,引起动作电位的重复发放,增强峰钠电流,延缓峰钠传导的关闭,使昆虫产生快速的兴奋性麻痹。该类毒素毒性较强,如从北非蝎(*Androctonus australis* Hector)分离的 AaHITI^[34]、从东亚钳蝎(*Buthus martensii* Karsch)分离的 Bm32-IV 和 BmKIT^[35]等。

3.2.2 抑制型昆虫毒素。采用膜片钳技术研究表明,该类毒素能封闭被诱发的动作电位,降低钠峰电流,抑制钠电流,使昆虫产生阻抑性软瘫。如从 *Buthus judaicus* 中分离的 BjtIT^[34]、从 *Buthus martensii* Karsch 中分离的 BmKITa 和 BmKITb^[35]及从 *Buthus occitanus* Tunetanus 中分离的 Bot IT^[36]

毒素等。从 *Buthus indicus* 分离到的 4 个抑制性昆虫毒素 Bs-dpr IT 1~4^[37] 结构与众不同,值得深入研究。

3.2.3 α -型昆虫毒素。该组成员特异性较差,对昆虫毒性比对哺乳动物强,采用膜片钳技术研究显示该类毒素以电压依赖方式作用于 Na^+ 通道位点 3,通过抑制 Na^+ 通道灭活而延长动作电位,减缓 Na^+ 通道的快速失活,引起昆虫滞后但持久的收缩麻痹^[38]。它们可竞争抑制 AaIII 对小鼠脑 Na^+ 通道的结合。从 *Leiurus LqhIII*, *Centruroides* 和 *Tityus* 中分离的蝎毒多肽作用于昆虫的 Na^+ 通道的电生理特性即为典型的 α -毒素的例证^[39]。从 *Leiurus quinquestriatus* Hebraeus 分离的 LqhaIT^[34] 也属于该类毒素。

3.2.4 β -型昆虫毒素。 β -型昆虫毒素是不依赖于膜电位的高亲和力结合的位点 4 毒素^[40],采用膜片钳技术研究表明该类毒素能减慢钠电流的激活过程,降低峰钠电流。该类毒素可作用于哺乳动物和昆虫,在鼠脑突触体上能与 CssII [来自墨西哥蝎 (*Centruroides suffusus*)] 竞争结合,在昆虫神经元上可与兴奋性昆虫毒素 AaHIT1 和抑制型毒素 LqhIT2 竞争结合 Na^+ 通道^[41]。

3.2.5 其他类型昆虫毒素。随着对 Na^+ 通道毒素研究的深入,发现许多毒素不能完全归为上述几类。例如, LqhIII 等蝎毒素可影响蟑螂轴突上的 Na^+ 通道,延长动作电位,降低钠电流,尾电流减慢且不完全。这些电生理特点使其被称为 α -like 毒素^[42]; BmKM7 也属 α -like 毒素,对动物和昆虫都有毒性^[43]。

β -like 毒素 BmKabT 对小鼠有毒并可引起昆虫的麻痹,然而采用膜片钳技术研究表明该类似 β 型毒的多肽却能延长动作电位时程和增强钠电流^[44]; CsEV 从功能上看是 β 型毒素,但其序列更类似于 α 型毒素的序列,表明它们可能都是一个 α - β 毒素间的过渡体^[45-46]。

3.3 其他昆虫毒素 另外,通过膜片钳技术发现其他动植物中有许多昆虫 Na^+ 通道非肽类毒素,例如海葵毒素 BgII^[47]、植物中的藜芦碱和 N-烷基酰胺类^[48] 化合物等能结合在昆虫 Na^+ 通道位点 2,对昆虫 Na^+ 通道产生毒害作用,均可开发为生物杀虫剂。

4 膜片钳技术在生物杀虫剂研发中的作用

虫害是造成农业减产的主要原因之一,目前控制虫害的主要方法是使用化学农药,但化学农药的大量使用产生了许多问题,如越来越多的昆虫产生抗药性并不断传播、农药残留污染环境、杀伤昆虫天敌、破坏生态平衡造成害虫再猖獗等,研发新型高效安全的生物杀虫剂势在必行。

来自动植物体内的昆虫毒素专一性作用于昆虫,而对哺乳动物无害或毒性很小,具有特异性和高度选择性,作为新型安全生物杀虫剂展示出巨大潜力,倍受国内外生物科学工作者的青睐^[49]。各类昆虫毒素对害虫的毒杀机制不同,分析各类毒素的作用机理及抗性产生机制已成为研发新型安全生物杀虫剂的关键。

膜片钳技术自发展以来,在理论及实验技术上有了较快速发展^[50],为新型安全生物杀虫剂的研发提供了有力保障。

膜片钳技术能分辨通过细胞膜上单个通道的电流,从而有利于对通道的电导及其动力学、药理学特征以及通道的调节机制进行深入研究。膜片钳技术的优势在于在通道电流记录中可分别于不同时间、不同部位(膜外或膜内)施加各种不同浓度的毒素,研究它们对通道功能可能造成的影响,可深入了解选择性作用于昆虫通道的毒素影响昆虫生理功能的分子机理和作用靶点。在新型生物杀虫剂的筛选中,将目的毒素直接施加于培养或急性分离细胞内或外,借助特定离子通道阻断剂,利用膜片钳技术可迅速判明毒素作用靶点及作用方式^[51],为新型安全生物杀虫剂的研发奠定基础。另外,随着基因工程和分子生物学的飞速发展,培育专一作用于昆虫的抗虫转基因作物为害虫防治提供了一条新途径。澳大利亚公司通过膜片钳技术从悉尼漏斗蛛中分离纯化到专一作用于昆虫的多肽毒素,再根据该肽的氨基酸序列采用植物偏爱的密码子人工合成并克隆该肽的基因转入烟草中,能明显抑制昆虫蜕皮和生长发育,表现出显著的抗虫作用。目前科研工作通过膜片钳技术已从蜘蛛、蝎等有毒动物中分离出多种杀虫肽,在农林业的生物防治中有着广阔的应用前景^[52]。

5 结语

膜片钳技术是研究细胞膜离子通道最基本和最直接的实验方法,在对天然毒素杀虫作用机理的研究中发挥了巨大作用。与传统的化学农药和微生物杀虫剂相比,生物杀虫剂具有选择性强、使用安全、投资少、见效快的优点,而且对于植物的保护作用具有连续性和全面性。因此,通过膜片钳技术研究天然毒素对昆虫 Na^+ 通道的作用机理为寻找和开发昆虫毒素型生物杀虫剂及培育抗虫转基因作物提供了材料来源,在新型安全生物杀虫剂的研发中将发挥巨大作用。

参考文献

- [1] NEHER E, SAKMANN B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres[J]. Nature, 1976, 260: 799-802.
- [2] HAMILL O P, MARTY A, NEHER E, et al. Improved Patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches[J]. Pflügers Arch, 1981, 391(2): 85-100.
- [3] HILL B. Ionic channels of excitable membrane[M]. 2nd ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1992: 524-544.
- [4] VAIS H, WILLIAMSON M S, GOODSON S J, et al. Activation of *Drosophila* sodium channels promotes modification by deltamethrin reductions in affinity caused by knock-down resistance mutations[J]. J Gen Physiol, 2000, 115(3): 305-318.
- [5] CESTÈLE S, SCHEUER T, MANTEGAZZA M, et al. Neutralization of gating charges in domain II of the sodium channel α subunit enhances voltage-sensor trapping by α β -scorpion toxin[J]. J Gen Physiol, 2001, 118(3): 291-302.
- [6] WARMKE J W, REENAN R A, WANG P, et al. Functional expression of *Drosophila* para sodium channels. Modulation by the membrane protein TipE and toxin pharmacology[J]. J Gen Physiol, 1997, 110(2): 119-133.
- [7] GOLDIN A L, BARCHI R L, CALDWELL J H, et al. Nomenclature of voltage-gated sodium channels[J]. Neuron, 2000, 28(2): 365-368.
- [8] NICHOLSON G M. Insect-selective spider toxins targeting voltage-gated sodium channels[J]. Toxicon, 2007, 49(4): 490-512.
- [9] GOUDET C, CHI C W, TYTGAT J. An overview of toxins and genes from the venom of the Asian scorpion *Buthus martensi* Karsch[J]. Toxicon, 2002, 40(9): 1239-1258.
- [10] TERLAU H, OLIVERA B M. Conus venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides[J]. Physiol Rev, 2004, 84(1): 41-68.
- [11] BLUMENTHAL K M, SEIBERT A L. Voltage-gated sodium channel tox-

- ins;poisons,probes,and future promise[J]. Cell Biochem Biophys,2003,38(2):215-238.
- [12] NORTON R S. Structure and structure-function relationships of sea anemone proteins that interact with the sodium channel[J]. Toxicon,1991,29(9):1051-1084.
- [13] ESCOUBAS P, DIOCHOT S, CORZO G. Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins[J]. Biochimie,2000,82(9/10):893-907.
- [14] CATTERAL W A. Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels[J]. Physiol Rev,1992,72(4):15-48.
- [15] CATTERAL W A. Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels[J]. Ann Rev Biochem,1986,55:953-985.
- [16] CESTELE S, CATTERALL W A. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels[J]. Biochimie,2000,82(9/10):883-892.
- [17] KING G F, ESCOUBAS P, NICHOLSON G M. Peptide toxins that selectively target insect Na(V) and Ca(V) channels[J]. Channels (Austin),2008,2(2):100-116.
- [18] LI D, XIAO Y, HU W, et al. Function and solution structure of hainantoxin-I, a novel insect sodium channel inhibitor from the Chinese bird spider *Selenocosmia hainana*[J]. FEBS Lett,2003,555:616-622.
- [19] WANG R, LIANG S. Effects of toxin huwentoxin-III from the venom of the Chinese bird spider, *Ornithoctonus huwena* (Araneae:Theraphosidae) on neuronal voltage-gated ion channels in cockroach *Periplaneta americana* [J]. Acta Entomologica Sinica,2009,52(2):126-132.
- [20] WANG R, YI S, LIANG S. Mechanism of action of two insect toxins huwentoxin-III and hainantoxin-VI on voltage-gated sodium channels[J]. Zhejiang University Science B,2010,11(6):451-457.
- [21] DE LIMA M E, STANKIEWICZ M, HAMON A, et al. The toxin T α 4 (6-1) from the spider *Phoneutria nigriventer* slows down Na⁺ current inactivation in insect CNS via binding to receptor site 3[J]. Insect Physiol,2002,48(1):53-61.
- [22] NICHOLSON G M, WALSH R, LITTLE M J, et al. Characterization of the effects of robustoxin, the lethal neurotoxin from the Sydney funnel-web spider *Atrax robustus*, on sodium channel activation and inactivation[J]. Pflugers Arch,1998,436(1):117-126.
- [23] WANG R L, PAN J Y, XIAO Y C, et al. Hainantoxin-VI, a novel tarantula neurotoxin inhibiting insect Voltage-gated sodium channel inactivation [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biol,2008,24(9):796-802.
- [24] GROLLEAU F, STANKIEWICZ M, BIRINYI-STRACHAN L C, et al. Electrophysiological analysis of the neurotoxic action of a funnel-web spider toxin, δ -atratoxin-HV1a on insect voltage-gated Na⁺ channels[J]. J Exp Bio,2001,204:711-721.
- [25] CORZO G, GILLES N, SATAKE H, et al. Distinct primary structures of the major peptide toxins from the venom of the spider *Macrohele gigas* that bind to sites 3 and 4 in the sodium channel[J]. FEBS Lett,2003,547(1/3):43-50.
- [26] CORZO G, ESCOUBAS P, STANKIEWICZ M, et al. Isolation, synthesis and pharmacological characterization of delta-palutoxins IT, novel insecticidal toxins from the spider *Paracoelotes luctuosus* (Amaurobiidae) [J]. Eur J Biochem,2000,267(18):5783-5795.
- [27] CORZO G, ESCOUBAS P, VILLEGAS E, et al. A spider toxin that induces a typical effect of scorpion α -toxins but competes with β -toxins on binding to insect sodium channels[J]. Biochemistry,2005,44:1542-1549.
- [28] FERRAT G, BOSMANS F, TYTGAT J, et al. Solution structure of two insect-specific spider toxins and their pharmacological interaction with the insect voltage-gated Na⁺ channel[J]. Proteins,2005,59:368-379.
- [29] ADAMS M E, HEROLD E E, VENEMA V J. Two classes of channel specific toxins from funnel web spider venom[J]. J Comp Physiol,1989,164(3):333-342.
- [30] BLOOMQUIST J R, KINNE L P, DEUTSCH V, et al. Mode of action of an insecticidal peptide toxin from the venom of a weaving spider (*Diguetia canities*) [J]. Toxicon,1996,34(9):1072-1075.
- [31] GORDON D, KARBAT I, ILAN N, et al. The differential preference of scorpion-toxins for insect or mammalian sodium channels: implications for improved insect control[J]. Toxicon,2007,49:452-472.
- [32] CHAYEN N E, SHAW STEWART P D, BALDOCK P. New developments of the IMPAX small-volume automated crystallization system [J]. Acta Cryst,1994,50(4):456-458.
- [33] CHARLES C W, BALDWIN E T, FRICK L. Statistical design of experiments for protein crystal growth and the use of a precrystallization assay [J]. Journal of Crystal Growth,1988,90(1/3):60-73.
- [34] KUZNETSOV Y G, MALKIN A J, MCPHERSON A. The influence of precipitant concentration on macromolecular crystal growth mechanisms[J]. Journal of Crystal Growth,2001,232(1/4):114-118.
- [35] PIERRE ESCOUBAS, MARIA STANKIEWICZ, TOMOYO TAKAOKA, et al. Sequence and electrophysiological characterization of two insect-selective excitatory toxins from the venom of the Chinese scorpion *Buthus martensi* [J]. FEBS Letters,2000,483(2):175-180.
- [36] STANKIEWICZ M, GROLLEAU F, LAPIED B, et al. Bot IT₂, a toxin paralytic to insects from the *Buthus occitanus tunetanus* venom modifying the activity of insect sodium channels[J]. Insect Physiol,1996,42(4):397-405.
- [37] ALI S A, STOEVA S, GROSSMANN J G, et al. Purification, characterization, and primary structure of four depressant insect-selective neurotoxin analogs from scorpion (*Buthus indicus*) venom [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics,2001,391(2):197-206.
- [38] GORDON D, ZLOKTIN E. Binding of an alpha scorpion toxin to insect sodium channels is not dependent on membrane potential[J]. FEBS Lett,1993,315(2):125-128.
- [39] 赵灿国,孔天翰. 蝎毒素调控离子通道的研究新进展[J]. 河南职工医学院学报,2005,17(1):61-64.
- [40] GUREVITZ M, KARBAT I, COHEN L, et al. The insecticidal potential of scorpion β -toxins[J]. Toxicon,2007,49:473-489.
- [41] POSSANI L D, MERINO E, CORNA M. Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels[J]. Biochimie,2000,82(9/10):861-868.
- [42] KRIMM I, GILLES N, SAUTIERE P, et al. NMR structures and activity of a novel alpha-like toxin from the scorpion *Leiurus quinquestriatus hebraeus* [J]. J Mol Biol,1999,285(4):1749-1763.
- [43] GUAN R J, HE L, WANG M, et al. Purification, crystallization and initial structural solution of a new alpha-like toxin with cardiac toxicity from scorpion *Buthus martensii* Karsch [J]. Protein Pept Lett,2002,9(5):441-449.
- [44] YE J G, WANG C Y, LI Y J, et al. Purification, cDNA cloning and function assessment of BmKabT, a unique component from the old world scorpion species [J]. FEBS Lett,2000,479(3):136-140.
- [45] JI Y H, WANG W X, WANG Q, et al. The binding of BmKabT, a unique neurotoxin, to mammal brain and insect Na⁺ channels using biosensor [J]. Eur J Pharmacol,2002,454(1):25-30.
- [46] WATT DD, SIMARD J M. Neurotoxic proteins in scorpion venom [J]. J Toxicol Toxin Reviews,1984,3(2/3):181-221.
- [47] BOSMANS F, ANEIROS A, TYTGAT J. The sea anemone *Bunodosoma granulifera* contain surprisingly efficacious and potent insectselective toxins [J]. FEBS Letters,2002,532(1/2):131-134.
- [48] OTTEA J A, PAYNE G T, SODERLUND D M. Action of insecticidal N-alkylamides at site 2 of the voltage-sensitive sodium channel [J]. J Agric Food Chem,1990,38(8):1724-1728.
- [49] MICHAEL G, IZHAR K, LIOR C, et al. The insecticidal potential of scorpion β -toxins [J]. Toxicon,2007,49(4):473-489.
- [50] 汪海. 细胞膜膜片钳技术与离子通道药理学 [J]. 国外医学药学分册,1992,19(2):65-68.
- [51] 贺秉军,刘安西. 细胞电生理技术在昆虫抗药性研究中的应用 [J]. 昆虫学报,2001,44(4):574-581.
- [52] 王梧霖,史小军,米锡阳,等. 蜘蛛毒素的研究进展及其相关应用 [J]. 现代生物医学进展,2009,9(15):2989-2991.