

· 研究论文 ·

doi: 10.16801/j.issn.1008-7303.2024.0114

# 德国小蠊钠离子通道 V295N 突变对 $\alpha$ -蝎毒素 Lqh $\alpha$ IT 敏感性的影响

温淑璇<sup>1,2</sup>, 马媛<sup>3</sup>, 陆容材<sup>4</sup>, 耿俊杰<sup>1,2</sup>, 张坤<sup>\*,1,2</sup>, 吴少英<sup>\*,1,2</sup>

(1. 海南大学 三亚南繁研究院, 海南 三亚 572025; 2. 海南大学 热带农林学院 (农业农村学院、乡村振兴学院), 海口 570228; 3. 海口海关热带植物隔离检疫中心, 海口 570311; 4. 中山榄菊日化实业有限公司, 广州 528415)

**摘要:** 电压门控钠离子通道在细胞电信号传导中是必不可少的, 它控制神经元和其他可兴奋细胞间动作电位的启动和传播, 钠离子通道的快速失活过程是电信号传导的关键。蝎毒素作用于钠离子通道, 影响通道的失活速度, 因此解析蝎毒素与钠离子通道相互作用机制意义重大。通过比对德国小蠊 (*Blattella germanica*)、美洲大蠊 (*Periplaneta americana*) 和哺乳动物等钠离子通道的氨基酸序列, 发现 4 个差异氨基酸, 分别为 I291L、Y292F、V295N 和 L406I, 使用定点突变技术在德国小蠊钠离子通道上构建 4 种氨基酸突变质粒, 以非洲爪蟾卵母细胞作为表达载体, 经电生理检测发现, V295N 突变可显著降低钠离子通道对  $\alpha$ -蝎毒素 Lqh $\alpha$ IT 的敏感性 (约 21.63 倍)。进一步通过 3D 同源建模和蝎毒素分子对接发现, V295N 突变使得钠离子通道 M291 与 Lqh $\alpha$ IT 的 K63 位氨基酸形成了 1 个氢键, 阻碍其与 Lqh $\alpha$ IT 结合。综上, V295N 突变可间接影响钠离子通道与 Lqh $\alpha$ IT 的结合, 进而降低了钠离子通道对 Lqh $\alpha$ IT 的敏感性。

**关键词:** 德国小蠊; 钠离子通道; Lqh $\alpha$ IT; 定点突变; 双电极电压钳; 同源建模  
中图分类号: S481.1 文献标志码: A

## Influence of the V295N mutation of *Blattella germanica* sodium channel on sensitivity to $\alpha$ -scorpion toxin Lqh $\alpha$ IT

WEN Shuxuan<sup>1,2</sup>, MA Yuan<sup>3</sup>, LU Rongcai<sup>4</sup>, GENG Junjie<sup>1,2</sup>, ZHANG Kun<sup>\*,1,2</sup>, WU Shaoying<sup>\*,1,2</sup>

(1. Sanya Nanfan Research Institute, Hainan University, Sanya 572025, Hainan Province, China; 2. School of Tropical Agriculture and Forestry (School of Agricultural and Rural, School of Rural Revitalization), Hainan University, Haikou 570228, China; 3. Post-Entry Quarantine Station for Tropical Plant, Haikou Customs District, Haikou 570311, China; 4. Zhongshan Lanju daily chemical Industry Co., Ltd, Guangzhou 528415, China)

**Abstract:** Voltage-gated sodium channels (VGSCs) are essential in cell electrical signal transmission, which controls the initiation and propagation of action potentials between neurons and other excitable cells, and rapid inactivation of sodium channels is critical for electrical signalling. Scorpion toxins act on sodium channels and affect the rapid deactivation rate of the channels. Therefore, it is of great importance to analyze the interaction mechanism between scorpion toxins and sodium channels. By

收稿日期: 2024-08-31; 录用日期: 2024-12-19; 网络首发日期: 2025-01-08.

Received: August 31, 2024; Accepted: December 19, 2024; Published online: January 8, 2025.

URL: <https://doi.org/10.16801/j.issn.1008-7303.2024.0114>

<http://www.nyxxb.cn/cn/article/doi/10.16801/j.issn.1008-7303.2024.0114>

基金项目: 三亚崖州湾菁英人才科技专项项目 (No. SCKJ-JYRC-2023-15).

Funding: Supported by Project of Sanya Yazhou Bay Science (No. SCKJ-JYRC-2023-15).

第一作者 (First author): 温淑璇, E-mail: [wsx2690607177@163.com](mailto:wsx2690607177@163.com). 通信作者 (Corresponding authors): 张坤, E-mail: [kunzhang996164@hainanu.edu.cn@163.com](mailto:kunzhang996164@hainanu.edu.cn@163.com); 吴少英, E-mail: [wsywsy6000@hainanu.edu.cn](mailto:wsywsy6000@hainanu.edu.cn).

The authors declare that they have no competing interests.



comparing the amino acid sequences of *Blattella germanica*, *Periplaneta americana* and mammalian sodium channels, it was found that four different amino acids found are I291L, Y292F, V295N, and L406I. Site-directed mutation technique was used to construct four amino acid mutant plasmids on the *B. germanica* VGSCs, and *Xenopus* oocytes were employed as vehicles for gene expression. Electrophysiological results showed that the V295N mutation significantly reduced the sensitivity of the sodium channel to  $\alpha$ -scorpion toxin Lqh IT (approximately 21.63 - fold). Further 3D homology modeling and molecular docking of the scorpion toxin revealed that the V295N mutation discovered sodium channel M291 to form a hydrogen bond with the K63 amino acid of Lqh $\alpha$ IT, which prevented its binding with Lqh $\alpha$ IT. In conclusion, V295N mutation indirectly affected the binding of the channel to Lqh $\alpha$ IT, resulting in a reduction in the sensitivity of the channel to Lqh $\alpha$ IT.

**Keywords:** *Blattella germanica*; sodium channel; Lqh $\alpha$ IT; site-directed mutagenesis; two-electrode voltage clamp; homologous modeling

德国小蠊 (*Blattella germanica*) 俗名德国蟑螂, 属于蜚蠊目 (Blattaria) 蜚蠊科 (Blattidae), 是一种栖息于人类周围, 分布于世界各地的卫生害虫<sup>[1]</sup>。因其独特的取食特点和繁殖习性, 成为各种病原体和寄生虫的携带者和传播者<sup>[2]</sup>。此外, 德国小蠊的粪便、分泌物及尸体残骸可以引发严重的过敏反应<sup>[3]</sup>。德国小蠊不仅是世界性家居卫生害虫, 更作为一种模式昆虫, 常被用于研究神经类药物 (如蝎毒素) 与钠离子通道的相互作用关系<sup>[4-5]</sup>, 为设计高选择性新型杀虫剂提供理论基础。

电压门控钠离子通道 (voltage-gated sodium channels) 是一种通道蛋白, 负责可兴奋细胞中动作电位的启动和传播, 具有兴奋细胞 (如肌肉细胞、神经细胞等) 的作用<sup>[6]</sup>。哺乳动物的钠离子通道由 1 个  $\alpha$  亚基和 1~2 个  $\beta$  亚基 ( $\beta 1\sim\beta 4$ ) 组成<sup>[6-7]</sup>。 $\alpha$  亚基包含 24 个跨膜螺旋片段, 划分为 4 个同源结构域 (Domain I~IV), 每个同源结构域由 6 个跨膜片段 (S1~S6) 构成<sup>[8-9]</sup>。其中, S1~S4 组成电压感受模块 (voltage-sensing module, VSM), S5~S6 构成孔模块 (pore module, PM), S4 上带正电荷的保守氨基酸残基是钠离子通道电压传感器, 能够感受到膜电位的变化并向外移动, 改变通道构象, 进而导致通道的开放并产生内向电流<sup>[10]</sup>。Domain III 和 Domain IV 之间的多肽链含有高度保守的快速失活阀门, 介导钠离子通道的快速失活过程<sup>[11]</sup>。哺乳动物钠离子通道的  $\alpha$  亚基具有 9 种亚型, 每种亚型都在不同的细胞类型中发挥各自的生理功能<sup>[12]</sup>。与哺乳动物相比, 昆虫只有一个编码钠离子通道  $\alpha$  亚基的同源基因, 但是昆虫可以通过选择性剪切以及 RNA 编辑, 形成多个具有

不同门控特性和药理学性质的钠离子通道剪切变体<sup>[13-15]</sup>。此外, 昆虫没有哺乳动物钠离子通道  $\beta$  亚基的直系同源基因<sup>[16]</sup>, 仅有对钠离子通道表达过程起调控作用的辅助蛋白 TipE 和 TipE 的同源蛋白 (TEH1~4)<sup>[17-19]</sup>。

作用于钠离子通道的蝎毒素分为两类: 1) 与位点 3 结合的  $\alpha$ -蝎毒素; 2) 与位点 4 结合的  $\beta$ -蝎毒素<sup>[20]</sup>。其中钠离子通道 Domain I 的 PM 区域和 Domain IV 的 VSM 区域参与位点 3 的形成<sup>[21-22]</sup>, Domain II 的 VSM 区域和 Domain III 的 PM 区域参与位点 4 的形成<sup>[23]</sup>。 $\alpha$ -蝎毒素能显著减缓钠离子通道的快速失活过程<sup>[24]</sup>, 这可能是因为  $\alpha$ -蝎毒素结合于位点 3, 抑制 Domain IV 的跨膜片段 S4 的向外移动过程, 而这个过程是快速失活所必需的通道构象变化<sup>[25]</sup>。根据  $\alpha$ -蝎毒素的不同药理学偏性, 可以将其分为 3 个亚组: 经典  $\alpha$ -蝎毒素、 $\alpha$ -like 蝎毒素和昆虫  $\alpha$ -蝎毒素, 其中经典  $\alpha$ -蝎毒素对哺乳动物的毒性很大,  $\alpha$ -like 蝎毒素对哺乳动物和昆虫均有一定毒性, 昆虫  $\alpha$ -蝎毒素则作用于昆虫钠离子通道, 对昆虫的毒性很大<sup>[20]</sup>。

来自以色列金蝎 (*Leiurus quinquestriatus hebraeus*) 的毒素 Lqh $\alpha$ IT, 属于昆虫  $\alpha$ -蝎毒素, 能显著抑制钠离子通道的快速失活, 延长动作电位, 特别的是, 其与昆虫神经元膜的结合亲和力高而对哺乳动物毒性低<sup>[26-27]</sup>。为进一步解析 Lqh $\alpha$ IT 特有的药理学偏性, Karbat 等<sup>[28]</sup>对 Lqh $\alpha$ IT 进行定点诱变, 发现 Lqh $\alpha$ IT 功能区域的 NC 结构域可能是导致 Lqh $\alpha$ IT 对昆虫选择性高毒的主要原因。Lqh $\alpha$ IT 作用靶标位于昆虫钠离子通道结合位点 3, 该位点包括 Domain I 上 PM 中及 Domain IV 上 VSM 中

的氨基酸残基<sup>[29]</sup>。然而, 以钠离子通道为主体的研究主要集中在 Domain IV 的 VSM 区域, 对 Domain I 的 PM 区域或位点 3 之外区域的研究较少<sup>[23, 29-30]</sup>。蝎毒素不仅是探测钠离子通道结构、研究其活化和灭活过程的重要药理学材料, 更因其选择性作用于哺乳动物和昆虫钠离子通道, 可以应用于研发杀虫剂的增效剂和开发新型杀虫剂。

本研究以  $\alpha$ -蝎毒素 Lqh $\alpha$ IT 作为靶标药剂, 利用其对昆虫钠离子通道的独特选择性, 通过比对昆虫和哺乳动物的钠离子通道序列, 寻找 Domain I 上 PM 中保守区域内的差异氨基酸残基, 并以此为基础, 利用电生理学和计算机模拟建模, 研究 Lqh $\alpha$ IT 与德国小蠊钠离子通道相互作用的分子机制, 为新型  $\alpha$ -蝎毒素的开发和害虫防治应用实践提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与试剂

试验材料: 德国小蠊钠离子通道质粒 (Bg Na<sub>v</sub>1-1) 和 TipE 质粒<sup>[31-32]</sup>, 由美国密歇根大学董珂教授赠予;  $\alpha$ -蝎毒素 Lqh $\alpha$ IT 由天津大学药学院尉迟之光教授提供; 非洲雌性爪蟾购于云南昆明动物研究所, 并置于 18 °C 恒温条件下饲养。

试剂: 苯酚、DNA Marker, 南京诺唯赞公司; 感受态细胞 Stbl-2, 上海唯地公司; 限制性内切酶 (*Dpn* I、*Not* I), 美国 NEB 公司; 胶原蛋白酶 Collagenase Type I Lyophilized, 美国 Roche 公司; 质粒提取试剂盒 Plasmid DNA Mini Kit, 美国 OMEGA 公司; 基因定点突变试剂盒 Phusion Hight-Fidelity PCR Kit、体外合成 cRNA 试剂盒 mMESSAGE mMACHINE™ T7, 美国 Thermo Fisher 公司。

### 1.2 试验方法

1.2.1 德国小蠊钠离子通道定点突变 从 NCBI 数据库依次下载德国小蠊 (*Blattella germanica*)、美洲大蠊 (*Periplaneta americana*)、智人 (*Homo sapiens*) 和大鼠 (*Rattus norvegicus*) 的钠离子通道序列, 利用 MegAlign 软件比对氨基酸序列。根据德国小蠊钠离子通道的基因序列 (NCBI 登录号: LC374291.1), 设计上下游引物 (表 1), 以德国小蠊钠离子通道质粒为模板, 利用 Phusion Hight-Fidelity PCR Kit 试剂盒进行基因定点突变, PCR 反应体系 (50  $\mu$ L): 5  $\times$  Phusion HF Buffer

10  $\mu$ L, dNTP 1.0  $\mu$ L, forward primer 2.5  $\mu$ L, reverse primer 2.5  $\mu$ L, template 1.0  $\mu$ L, 二甲基亚砷 (DMSO) 1.5  $\mu$ L, phusion high fidelity DNA polymerase 0.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 31  $\mu$ L。PCR 反应程序: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 10 s, 50 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 6.5 min, 总计 18 个循环, 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。取 15  $\mu$ L PCR 产物与 0.5  $\mu$ L *Dpn* I 混匀, 于 37 °C 反应 1 h。采用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳, 再用紫外凝胶成像仪观察。电泳结果确认后, 选用 Stbl-2 感受态细胞进行转化, 挑取单克隆菌进行摇菌培养 48 h 后, 选用 Plasmid DNA Mini Kit 试剂盒进行质粒提取, 并取 10  $\mu$ L 质粒送至上海擎科生物科技有限公司进行测序。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物名称 Name of prime	引物序列 (5'-3') Sequence of prime (5'-3')
I291L-F	TTAATGGGGCTCCAGCTATACATGGGTGTCTC
I291L-R	GAGGACACCCATGTATAGCTGGAGCCCCATTAA
Y292F-F	ATGGGGCTCCAGATTACATGGGTGTCTCACG
Y292F-R	CGTGAGGACACCCATG <b>T</b> AAATCTGGAGCCCCAT
V295N-F	CAGATTTACATGGGTA <b>A</b> CCCTCACGCAGAAGTGC
V295N-R	GCACCTCTCGCTGAG <b>G</b> TACCCATG <b>T</b> AAATCTG
L406I-F	GGGCCCTGGCATATGAT <b>C</b> TCTTCTCATTGTTCATC
L406I-R	GATGACAATGAAGAAGATCATATGCCAGGGCCC

注: 黑色加粗为突变位点。

Note: Black bold is the mutation location.

1.2.2 cRNA 合成与爪蟾卵母细胞表达 选用限制性内切酶 *Not* I 将德国小蠊钠离子通道野生型质粒、钠离子通道突变型质粒和 TipE 质粒分别进行单酶切线性化, 以单酶切产物为模板, 利用 mMESSAGE mMACHINE™ T7 转录试剂盒进行 cRNA 的体外合成。

挑选健康的雌性非洲爪蟾进行手术取卵, 选用 Collagenase Type I Lyophilized 对获取的爪蟾卵母细胞在 1.5 mg/mL 下进行酶解, 待卵母细胞滤泡膜脱落后挑选 V~VI 期黑白分明的卵母细胞, 备用。将德国小蠊钠离子通道的 cRNA 和 TipE 的 cRNA 按浓度比 1 : 1 以 30 nL 的量注射到单个爪蟾卵母细胞里, 并置于 ND96 培养液 (96.0 mmol/L NaCl, 2.0 mmol/L KCl, 1.8 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 1.0 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 5.0 mmol/L HEPES, 2.5 mmol/L Na-pyruvate, 0.5 mmol/L Theophylline, pH = 7.5, 0.22  $\mu$ m 微孔过滤膜过滤后加入 100 mg/mL Genta-

micin) 中培养 1~2 d, 采用双电极电压钳记录其峰值电流, 峰值电流在 2~4  $\mu\text{A}$  为正常发挥功能的卵母细胞, 可进行下一步试验。

### 1.2.3 $\alpha$ -蝎毒素 Lqh $\alpha$ IT 对钠离子通道的作用效果

用 PBS 缓冲液溶解  $\alpha$ -蝎毒素 Lqh $\alpha$ IT, 制成 10 mmol/L 母液。用 Recording 溶液 (96.0 mmol/L NaCl, 2.0 mmol/L KCl, 1.8 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ , 1.0 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 10.0 mmol/L HEPES, pH = 7.5) 稀释母液, 配制成 1、4、10、40、100、400、1000、4000、10 000、40 000 nmol/L 系列梯度, 备用。将含有德国小蠊钠离子通道突变基因的卵母细胞钳制在 -90 mV, 并给予 -15 mV 的电压刺激 20 ms 后再回到 -90 mV 的钳制电压, 可以观察到细胞产生一个内向的电流, 待电流稳定后依次检测系列浓度梯度 Lqh $\alpha$ IT 的作用效果。用 Clampex 10.7 软件记录 Lqh $\alpha$ IT 作用前的电流峰值 ( $I_{\text{peak}}$ ) 以及 -15 mV 去极化刺激后 4~5 ms 内的电流平均值 ( $I_{5\text{ms}}$ ), 用 Clampfit 10.7 软件进行数据分析。以  $I_{5\text{ms}}/I_{\text{peak}}$  作为衡量在 Lqh $\alpha$ IT 作用下的钠离子通道快速失活后的延缓比例, 将这个比值记为 y 轴、Lqh $\alpha$ IT 的浓度记为 x 轴, 绘制散点图, 用 Origin 2021 软件拟合曲线并计算  $\text{EC}_{50}$  值。计算见公式 (1):

$$\frac{I_{5\text{ms}}}{I_{\text{peak}}} = a_0 + \frac{a_1 - a_0}{1 + \left(\frac{\text{EC}_{50}}{C_T}\right)^H} \quad (1)$$

式中:  $H$  是 Hill 系数,  $a_1 - a_0$  为高浓度毒素导致的最大抑制效果,  $a_0$  为毒素作用前的  $I_{5\text{ms}}/I_{\text{peak}}$  值,  $C_T$  为毒素浓度 (nmol/L),  $\text{EC}_{50}$  表示毒素达到

最强抑制效果一半时所对应的毒素浓度 (nmol/L), 每个浓度 3 个重复, 以  $\text{EC}_{50}$  值的大小来表示钠离子通道对毒素的敏感性。

1.2.4 同源建模与分子对接 基于美洲大蠊钠离子通道冷冻电镜结构 (PDB ID: 5X0M), 选用 Schrodinger 软件中的 Prime 模块构建 Bg Na $_v$ 1-1 同源模型, 将 V295N 突变引入到 Bg Na $_v$ 1-1 同源模型中, 用 UCSF Chimera 软件对 Bg Na $_v$ 1-1 同源模型进行能量最小化处理<sup>[33]</sup>。利用 ChemDraw 软件绘制 Lqh $\alpha$ IT 的结构, 利用 Schrodinger 软件中的 LigGprep 模块生成其 3D 构象, 并使用 Induced Fit Docking 模块将其与 Bg Na $_v$ 1-1 同源模型进行对接。

### 1.3 数据分析

利用 Origin 2021 对电生理数据进行统计分析, 采用单因素方差分析中的 Tukey 法进行差异显著性检验 ( $P < 0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 德国小蠊钠离子通道 V295N 突变体的构建

将德国小蠊、美洲大蠊、智人和大鼠的钠离子通道序列放在一起进行比对 (表 2), 在德国小蠊和美洲大蠊钠离子通道 Domain I 跨膜片段 S5 区域发现 3 个差异氨基酸, 分别为 I291L、Y292F 和 V295N, 在 Domain I 跨膜片段 S6 区域发现 1 个差异氨基酸, 为 L406I。

德国小蠊钠离子通道定点突变的 PCR 产物和 Dpn I 酶消解后的产物经凝胶电泳后都能看到单一

表 2 德国小蠊、美洲大蠊、智人、大鼠的钠离子通道 Domain I S5 和 Domain I S6 氨基酸序列对比

Table 2 Comparison of amino acid sequences at position Domain I S5 and Domain I S6 of sodium channels in *B. germanica*, *P. americana*, *H. sapiens* and *R. norvegicus*

物种 Species	序列号 Accession number	同源结构 I 第 5 跨膜片段 Domain I S5	同源结构 I 第 6 跨膜片段 Domain I S6
德国小蠊 <i>Blattella germanica</i>	LC374291.1	DVILTMFSLSVFALMGLQIYMGVLT	MLFFIVIIFLGFSFYLVNLILAIV
美洲大蠊 <i>Periplaneta americana</i>	GQ132119.1	DVILTMFSLSVFALMGLQIYMGVLT	MLFFIVIIFLGFSFYLVNLILAIV
智人 <i>Homo sapiens</i>	M91556.1	GVIIITLFFLSIFSLIGMGLFMGNLK	MIFFVVVSFLFSFYMASLFLGIL
大鼠 <i>Rattus norvegicus</i> 1.1	M22253.1	DVMILTVFCLSVFALIGLQLFMGNLR	MIFFVLVIFLGSFYLINLILAVV
大鼠 <i>R. norvegicus</i> 1.2	X03639.1	DVMILTVFCLSVFALIGLQLFMGNLR	MIFFVLVIFLGSFYLINLILAVV
大鼠 <i>R. norvegicus</i> 1.3	XP 008760142.1	DVMILTVFCLSVFALIGLQLFMGNLR	MIFFVLVIFLGSFYLVNLILAIV
大鼠 <i>R. norvegicus</i> 1.4	XM 006247559.4	DVMILTVFCLSVFALVGLQLFMGNLR	MIFFVVIIFLGSFYLINLILAVV
大鼠 <i>R. norvegicus</i> 1.5	AF353637.1	DVMVLTVFCLSVFALIGLQLFMGNLR	MIFFMLVIFLGSFYLVNLILAIV
大鼠 <i>R. norvegicus</i> 1.6	L39018.1	DVMILTVFCLSVFALIGLQLFHGNLS	MIFFVLVIFVGSFYLVNLILAIV
大鼠 <i>R. norvegicus</i> 1.7	XM 039105779.1	GAIALALFFLTVSSLFMGGLFMCNLK	MIFFVLISFWAFYMASLFLGIL
大鼠 <i>R. norvegicus</i> 1.8	XM 039078609.1	DVMVLTVFCLSVFALIGLQLFMGNLR	MIFFVLVIFVGSFYLVNLILAIV

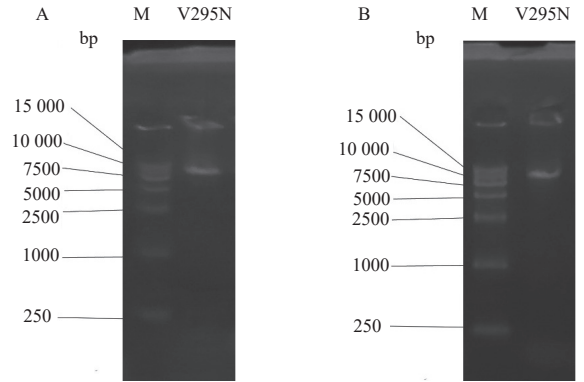
注: 红色位置为差异氨基酸。

Note: The red position is the differential amino acid.

的条带, 且大小 (9129 bp) 与预期片段大小相符合 (图 1)。将酶消解后的产物转至感受态细胞 Stbl-2, 经涂板培养后挑选单克隆菌摇菌并提取质粒送测。测序结果显示: 第 295 位氨基酸残基成功从缬氨酸 (V) 突变成天冬酰胺 (N), 保存测序正确的质粒用于后续的 cRNA 合成。

## 2.2 德国小蠊野生型和突变型钠离子通道对 LqhaIT 的敏感性测定

德国小蠊钠离子通道搭配辅助蛋白 TipE 在非洲爪蟾卵母细胞中表达, 给予去极化电压的刺激会产生典型的钠离子电流, 由于 I291L、Y292F 和 L406I 突变后表达峰值电流较小, 无法继续进行下一步试验 (附图 1)。正常的钠离子通道在激活后的 4~5 ms 内快速失活, 而在 LqhaIT 作用下, 通道的失活过程明显延缓 (图 2A)。相比于野生型钠离子通道, V295N 突变型在 1000 nmol/L LqhaIT 作用下的抑制失活作用明显下降 (图 2B)。为了进一步研究 V295N 突变型对 LqhaIT 敏感性的影



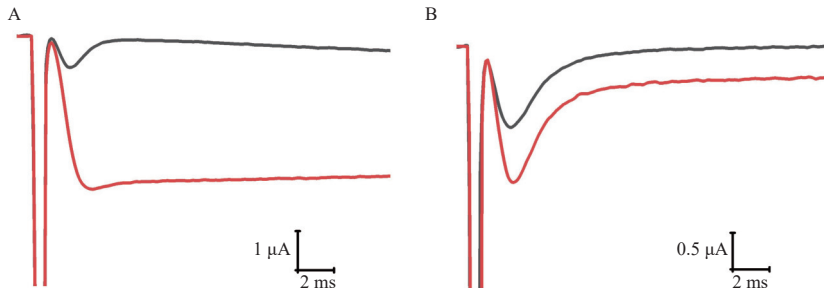
A: V295N 突变型 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图; B: V295N 突变型酶切后琼脂糖凝胶电泳图。

A: Agarose gel electrophoresis of PCR product of V295N mutation; B: Agarose gel electrophoresis of V295N mutation after digestion of enzyme.

图 1 德国小蠊钠通道 V295N 突变型构建

Fig. 1 Construction of the V295N mutation of the *B. germanica* sodium channel

响, 进行 LqhaIT 浓度梯度试验, 结果显示 (图 3A), 德国小蠊钠离子通道 V295N 突变型引起最大电流



A: 野生型 Bg Na<sub>v</sub>1-1; B: V295N 突变型 Bg Na<sub>v</sub>1-1。

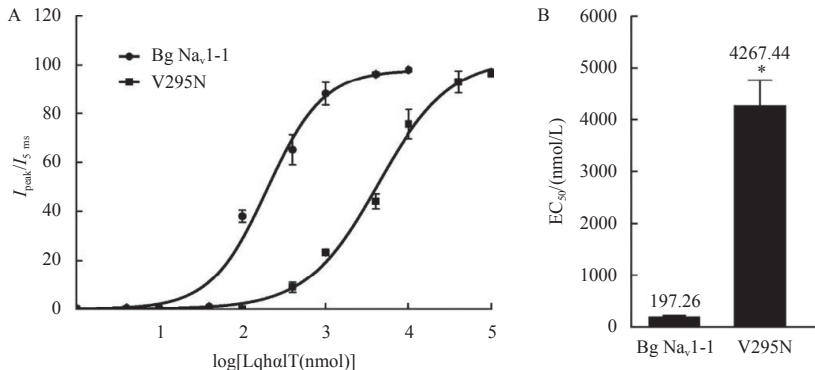
注: 黑色表示上药前峰值电流, 红色表示上药后峰值电流。

A: The wild type of Bg Na<sub>v</sub>1-1; B: The V295N mutation of Bg Na<sub>v</sub>1-1.

Note: Black indicates the peak current before application, and red indicates the peak current after application.

图 2 德国小蠊钠离子通道对 1000 nmol/L LqhaIT 敏感性的影响

Fig. 2 Influence of *B. germanica* sodium channel on the sensitivity of 1000 nmol/L LqhaIT



A: 浓度响应曲线; B: 引起最大电流反应一半所需的 LqhaIT 浓度 (EC<sub>50</sub> 值)。

A: Concentration response curves; B: The concentration of LqhaIT required to produce half of the maximum current response (EC<sub>50</sub> value).

图 3 德国小蠊钠离子通道野生型 Bg Na<sub>v</sub>1-1 和突变型 V295N 对 LqhaIT 的浓度响应

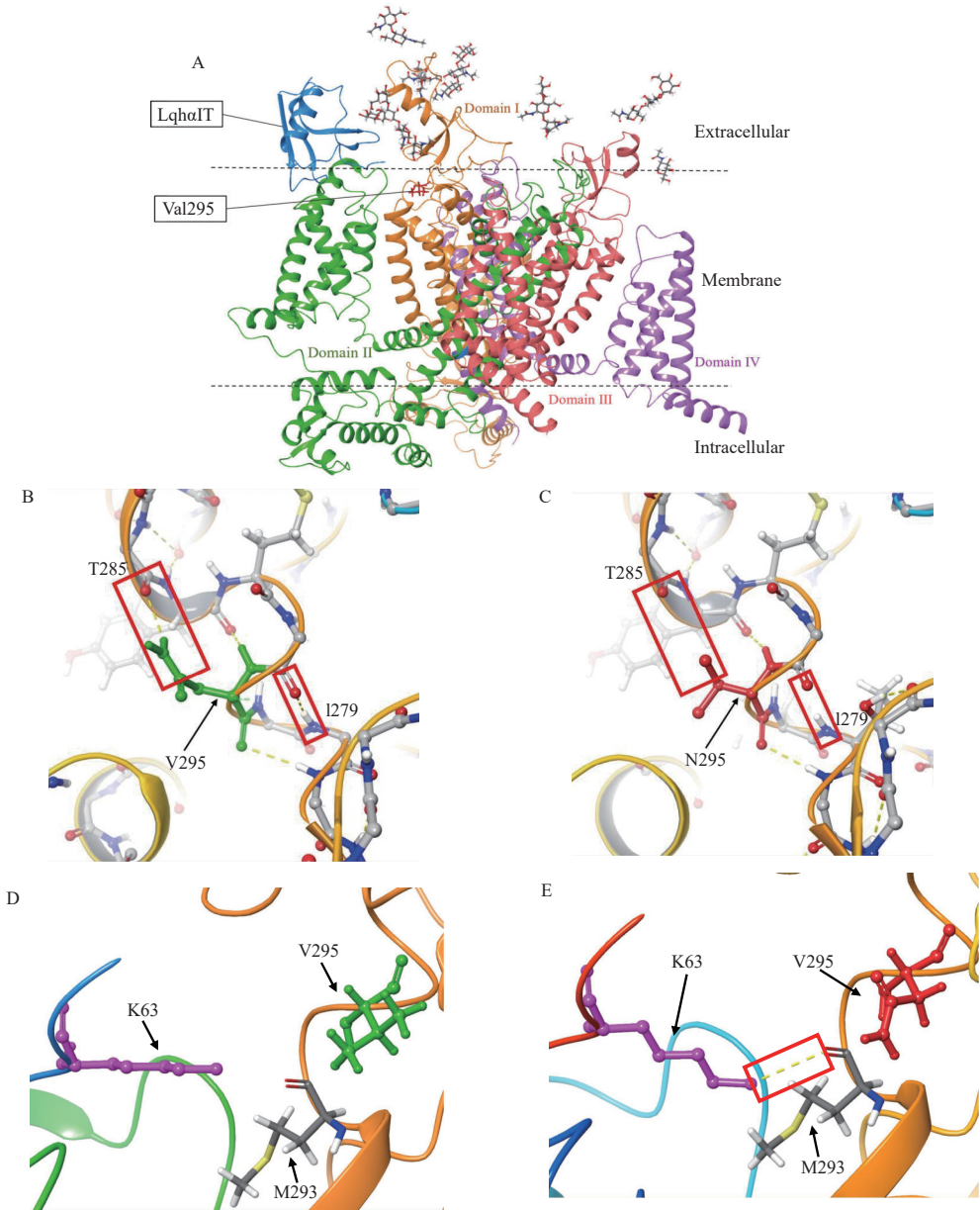
Fig. 3 Concentration response of wild-type Bg Na<sub>v</sub>1-1 and mutant V295N of *B. germanica* sodium channel to LqhaIT

反应一半所需的 LqhαIT 浓度 ( $EC_{50}$  值) 为 4267.44 nmol/L, 约是野生型 (197.26 nmol/L) 的 21.63 倍, V295N 突变型对 LqhαIT 的敏感性显著下降 ( $P < 0.05$ ) (图 3B)。

### 2.3 德国小蠊钠离子通道的结构建模

根据美洲大蠊钠离子通道的冷冻电镜结构 (PDB ID: 5X0M) 构建 Bg  $Na_v1-1$  的 3D 同源模型 (图 4), 突变位点 V295N 位于结合位点 3 Domain I 的跨膜片段 S5 末端, 与周围氨基酸形成一个口袋

结构, 由于这个口袋的空间较小, 无法与  $\alpha$ -蝎毒素 LqhαIT 结合, 表明 V295N 的突变是间接影响与  $\alpha$ -蝎毒素 LqhαIT 结合 (图 4A)。当氨基酸缬氨酸 (V) 变成天冬酰胺 (N) 后, 导致该位点与周围的氨基酸残基 T285 和 I279 氢键断裂 (图 4B 和图 4C), 使得原本能够紧密结合的氨基酸残基出现缺口, 影响了钠离子通道的稳定性。其次, 从带有疏水性侧链的脂肪族氨基酸残基 (V) 突变成带有中性侧链的氨基酸残基 (N), 也可能会导致钠离子通道



A: Bg  $Na_v1-1$  同源模型; B: V295 氨基酸残基三维结构图; C: N295 氨基酸残基三维结构图; D: V295 与 LqhαIT 结合预测图; E: N295 氨基酸残基与 LqhαIT 结合预测图。

A: Homologous model of Bg  $Na_v1-1$ ; B: V295 three-dimensional model of sodium channel; C: N295 three-dimensional model of sodium channel; D: Predicted binding modes of V295 targeting the LqhαIT; E: Predicted binding modes of N295 targeting the LqhαIT.

图 4 德国小蠊钠离子通道模拟结构

Fig. 4 Simulated structure of the sodium channel of *B. germanica*

蛋白的空间构象发生变化, 进而间接影响  $\alpha$ -蝎毒素 LqhaIT 与钠离子通道的结合。在此基础上进行  $\alpha$ -蝎毒素 LqhaIT 对接, 结果显示: V295N 突变改变了 Bg Na<sub>v</sub>1-1 与 LqhaIT 的 K63 位氨基酸残基之间的分子作用力 (图 4D 和图 4E), 当氨基酸缬氨酸 (V) 变成天冬酰胺 (N) 后, 导致 M291 与 K63 之间形成 1 个氢键, 使得与  $\alpha$ -蝎毒素 LqhaIT 结合口袋收缩, 阻碍了钠离子通道与  $\alpha$ -蝎毒素 LqhaIT 的结合。

### 3 结论与讨论

钠离子通道作为  $\alpha$ -蝎毒素的作用靶标, 二者间的相互作用机制一直是研究热点, 前人已通过大量试验确定,  $\alpha$ -蝎毒素 LqhaIT 靶标为钠离子通道结合位点 3<sup>[34-36]</sup>。该位点包括 Domain I 上 PM 区域和 Domain IV 上 VSM 区域<sup>[29]</sup>。阻碍跨膜片段 S4 的向外移动进而抑制钠离子通道的快速失活过程, 说明 Domain IV 上 VSM 中的跨膜片段 S4 在  $\alpha$ -蝎毒素和钠离子通道的相互作用中起着重要作用。为深入解析  $\alpha$ -蝎毒素与钠离子通道的作用机制, Rogers 等<sup>[30]</sup>发现其中第 1613 位谷氨酸 (E) 残基十分重要, E1613R 突变可以导致  $\alpha$ -蝎毒素 LqTx 的亲合力降低 62 倍, 证明 Domain IV 上 S3~S4 间的多肽链中的氨基酸残基影响  $\alpha$ -蝎毒素与位点 3 的结合。Gur 等<sup>[29]</sup>进一步对氨基酸残基 E1613 进行研究, 发现大鼠钠离子通道 1.2 (rNa<sub>v</sub>1.2) 中 E1613D 突变导致对  $\alpha$ -蝎毒素的敏感性发生改变, 从对哺乳动物  $\alpha$ -蝎毒素 Lqh2 高度敏感变成对昆虫  $\alpha$ -蝎毒素 LqhaIT 高度敏感。在昆虫中, Zhu 等<sup>[23]</sup>对德国小蠊钠离子通道剪切变体 (Bg Na<sub>v</sub>1-1a) 的 Domain III 的 VSM 进行研究, 通过对 Domain III 上跨膜片段 S4 的最末端正电荷氨基酸残基 R4 和 R5 进行电荷反转突变, 发现 R4E 或 R5E 突变均增强 LqhaIT 与 Bg Na<sub>v</sub>1-1a 的结合。本研究结果表明, 位于结合位点 3 上 PM 中的氨基酸残基 V295 发生突变, 可以导致德国小蠊钠离子通道对  $\alpha$ -蝎毒素 LqhaIT 的敏感性发生变化。

天然门控调节毒素对钠离子通道具有高亲和力和特定的结合模式, 可以靶向结合并改变钠离子通道的构象, 是研究钠离子通道特性的重要工具<sup>[10]</sup>。蝎毒素与钠离子通道相互作用的分子机制仍在深入研究中。Du 等<sup>[37]</sup>在德国小蠊钠离子通道 Domain II 上 S1 ~ S2 间的多肽链中, 发现保守

氨基酸残基天冬氨酸 D802, 电生理结果显示该点对通道门控特性和对拟除虫菊酯类杀虫剂的抗性十分重要, 其中 D802K/G/A 突变会降低通道对溴氰菊酯的敏感性。该点在哺乳动物大鼠 rNa<sub>v</sub>1.2 的同源位置上是第 779 位谷氨酸 (E) 残基, 研究表明 E779Q/C 突变可降低  $\beta$ -蝎毒素 Css 4 的作用<sup>[38]</sup>。Zhorov 等<sup>[32]</sup>研究发现, D802K/G/A 突变显著提高德国小蠊钠离子通道对  $\beta$ -蝎毒素 Lqh-dprIT<sub>3</sub> 的敏感性。综上所述, 基于昆虫钠离子通道的特异性氨基酸残基, 研究蝎毒素与钠离子通道的相互作用机制是可行的。

本研究以德国小蠊为试验对象, 通过比对德国小蠊、美洲大蠊和哺乳动物钠离子通道基因序列信息, 发现在德国小蠊钠离子通道结合位点 3 的 Domain I 的跨膜片段 S5 上存在差异性氨基酸残基 V295, 通过定点突变和电生理检测, 发现德国小蠊钠离子通道 V295N 突变型显著降低通道对  $\alpha$ -蝎毒素 LqhaIT 的敏感性, 导致毒素抑制钠离子通道快速失活过程作用效率显著下降。通过计算机模拟表明, V295N 突变能够间接影响  $\alpha$ -蝎毒素 LqhaIT 与钠离子通道的结合, 说明昆虫钠离子通道 295 位置疏水性氨基酸参与维持昆虫钠离子通道构象的稳定, 阐明了  $\alpha$ -蝎毒素 LqhaIT 对哺乳动物与昆虫独特的选择性原因, 这为探索蝎毒素与钠离子通道作用的分子机制提供了新思路, 也为今后基于  $\alpha$ -蝎毒素设计和开发新型绿色杀虫剂提供理论基础。

### 参考文献 (References):

- [1] LIU K Y, MA S Y, ZHANG K, et al. Functional characterization of knockdown resistance mutation L1014S in the German cockroach, *Blattella germanica* (Linnaeus)[J]. *J Agric Food Chem*, 2023, 71(6): 2734-2744.
- [2] WANNIGAMA D L, DWIVEDI R, ZAHRAEI-RAMAZANI A. Prevalence and antibiotic resistance of gram-negative pathogenic bacteria species isolated from *Periplaneta americana* and *Blattella germanica* in Varanasi, India[J]. *J Arthropod Borne Dis*, 2014, 8(1): 10-20.
- [3] VAZIRIANZADEH B, MEHDINEJAD M, DEGHANI R. Identification of bacteria which possible transmitted by *Polyphaga aegyptica* (Blattodea: Blattellidae) in the region of Ahvaz, SW Iran[J]. *Jundishapur J Microbiol*, 2009, 2: 36-40.
- [4] SONG W Z, DU Y Z, LIU Z Q, et al. Substitutions in the domain III voltage-sensing module enhance the sensitivity of an insect sodium channel to a scorpion beta-toxin[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(18): 15781-15788.
- [5] OUKKACHE N, ELJAOUDI R, CHGOURY F, et al.

- Characterization of Am IT, an anti-insect  $\beta$ -toxin isolated from the venom of scorpion *Androctonus mauretanicus*[J]. Sheng Li Xue Bao, 2015, 67(3): 295-304.
- [6] O'MALLEY H A, ISOM L L. Sodium channel  $\beta$  subunits: emerging targets in channelopathies[J]. *Annu Rev Physiol*, 2015, 77: 481-504.
- [7] CATTERALL W A. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels[J]. *Neuron*, 2000, 26(1): 13-25.
- [8] CHEN M L, DU Y Z, WU S Y, et al. Molecular evidence of sequential evolution of DDT- and pyrethroid-resistant sodium channel in *Aedes aegypti*[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2019, 13(6): e0007432.
- [9] 潘雪莲, 杨磊, 袁琳琳, 等. 豆大扁马钠离子通道基因克隆及分析[J]. *热带生物学报*, 2022, 13(3): 249-258.
- PAN X L, YANG L, YUAN L L, et al. Cloning and analysis of sodium channel of *Megalurothrips usitatus*[J]. *J Trop Biol*, 2022, 13(3): 249-258.
- [10] JIANG D H, ZHANG J T, XIA Z Y. Structural advances in voltage-gated sodium channels[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 908867.
- [11] GOLDIN A L. Mechanisms of sodium channel inactivation[J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2003, 13(3): 284-290.
- [12] GOLDIN A L, BARCHI R L, CALDWELL J H, et al. Nomenclature of voltage-gated sodium channels[J]. *Neuron*, 2000, 28(2): 365-368.
- [13] TAN J G, LIU Z Q, NOMURA Y, et al. Alternative splicing of an insect sodium channel gene generates pharmacologically distinct sodium channels[J]. *J Neurosci*, 2002, 22(13): 5300-5309.
- [14] ZHANG K, CHEN M L, WANG H, et al. Molecular characterization and functional expression of voltage-gated sodium channel variants in *Apolygus lucorum* (Meyer-Dür)[J]. *Pest Manag Sci*, 2020, 76(6): 2095-2104.
- [15] DAVIES T E, FIELD L M, USHERWOOD P R, et al. A comparative study of voltage-gated sodium channels in the Insecta: implications for pyrethroid resistance in Anopheline and other Neopteran species[J]. *Insect Mol Biol*, 2007, 16(3): 361-375.
- [16] LITTLETON J T, GANETZKY B. Ion channels and synaptic organization: analysis of the *Drosophila* genome[J]. *Neuron*, 2000, 26(1): 35-43.
- [17] 吴少英, 段文波, 李芬, 等. 昆虫钠离子通道的研究进展[J]. *昆虫学报*, 2021, 64(7): 862-874.
- WU S Y, DUAN W B, LI F, et al. Research progress of insect sodium channels[J]. *Acta Entomol Sin*, 2021, 64(7): 862-874.
- [18] WANG L X, DU Y Z, NOMURA Y, et al. Distinct modulating effects of TipE-homologs 2-4 on *Drosophila* sodium channel splice variants[J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2015, 60: 24-32.
- [19] WANG L X, NOMURA Y, DU Y Z, et al. Differential effects of TipE and a TipE-homologous protein on modulation of gating properties of sodium channels from *Drosophila melanogaster*[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e67551.
- [20] BOSMANS F, TYTGAT J. Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion alpha-toxins[J]. *Toxicon*, 2007, 49(2): 142-158.
- [21] WANG J T, YAROV-YAROVY V, KAHN R, et al. Mapping the receptor site for alpha-scorpion toxins on a Na<sup>+</sup> channel voltage sensor[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(37): 15426-15431.
- [22] TEJEDOR F J, CATTERALL W A. Site of covalent attachment of alpha-scorpion toxin derivatives in domain I of the sodium channel alpha subunit[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(22): 8742-8746.
- [23] ZHU Q, DU Y Z, NOMURA Y, et al. Charge substitutions at the voltage-sensing module of domain III enhance actions of site-3 and site-4 toxins on an insect sodium channel[J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2021, 137: 103625.
- [24] CHEN J, TAN Z Y, ZHAO R, et al. The modulation effects of BmK I, an  $\alpha$ -like scorpion neurotoxin, on voltage-gated Na<sup>+</sup> currents in rat dorsal root ganglion neurons[J]. *Neurosci Lett*, 2005, 390(2): 66-71.
- [25] CESTÈLE S, CATTERALL W A. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels[J]. *Biochimie*, 2000, 82(9-10): 883-892.
- [26] HOUSSET D, HABERSETZER-ROCHAT C, ASTIER J P, et al. Crystal structure of toxin II from the scorpion *Androctonus australis* hexastor refined at 1.3 Å resolution[J]. *J Mol Biol*, 1994, 238(1): 88-103.
- [27] TUGARINOV V, KUSTANOVICH I, ZILBERBERG N, et al. Solution structures of a highly insecticidal recombinant scorpion alpha-toxin and a mutant with increased activity[J]. *Biochemistry*, 1997, 36(9): 2414-2424.
- [28] KARBAT I, FROLOW F, FROY O, et al. Molecular basis of the high insecticidal potency of scorpion  $\alpha$ -toxins[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(30): 31679-31686.
- [29] GUR M, KAHN R, KARBAT I, et al. Elucidation of the molecular basis of selective recognition uncovers the interaction site for the core domain of scorpion alpha-toxins on sodium channels[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(40): 35209-35217.
- [30] ROGERS J C, QU Y S, TANADA T N, et al. Molecular determinants of high affinity binding of  $\alpha$ -scorpion toxin and sea *Anemone* toxin in the S3-S4 extracellular loop in domain IV of the Na<sup>+</sup> channel  $\alpha$  subunit[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(27): 15950-15962.
- [31] DONG K. A single amino acid change in the Para sodium channel protein is associated with knockdown-resistance (kdr) to pyrethroid insecticides in German cockroach[J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 1997, 27(2): 93-100.
- [32] ZHOROV B S, DU Y Z, SONG W Z, et al. Mapping the interaction surface of scorpion  $\beta$ -toxins with an insect sodium channel[J]. *Biochem J*, 2021, 478(14): 2843-2869.
- [33] PETERSEN E F, GODDARD T D, HUANG C C, et al. UCSF Chimera: a visualization system for exploratory research and analysis[J]. *J Comput Chem*, 2004, 25(13): 1605-1612.
- [34] KOPPENHÖFER E, SCHMIDT H. Effect of scorpion venom on ionic currents of the node of Ranvier. I. The permeabilities P<sub>Na</sub> and P<sub>K</sub>[J]. *Pflugers Arch*, 1968, 303(2): 133-149.
- [35] SHEN H Z, LI Z Q, JIANG Y, et al. Structural basis for the modulation of voltage-gated sodium channels by animal toxins[J]. *Science*, 2018, 362: 6412.
- [36] CLAIRFEUILLE T, CLOAKE A, INFELD D T, et al. Structural basis of  $\alpha$ -scorpion toxin action on Na<sub>v</sub> channels[J]. *Science*, 2019, 363(6433): eaav8573.
- [37] DU Y Z, SONG W Z, GROOME J R, et al. A negative charge in transmembrane segment I of domain II of the cockroach sodium channel is critical for channel gating and action of pyrethroid insecticides[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010, 247(1): 53-59.
- [38] CESTÈLE S, YAROV-YAROVY V, QU Y S, et al. Structure and function of the voltage sensor of sodium channels probed by a beta-scorpion toxin[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(30): 21332-21344.