

寄生蜂毒液蛋白组成、功能及进化的研究进展

严智超, 叶昕海, 王蓓蓓, 方琦, 叶恭银*

(浙江大学昆虫科学研究所/农业部农业昆虫学重点实验室, 杭州 310058)

摘要: 寄生蜂是最为丰富多样的昆虫种群之一, 寄生策略多样, 寄主范围广泛, 是重要的生态调节因子和害虫天敌资源。毒液为寄生蜂所保守共有, 是寄生蜂成功寄生的关键因子, 可用于调控寄主的行为、免疫、发育和代谢等, 最终帮助寄生蜂成功寄生。寄生蜂毒液中所含的活性蛋白具有丰富多样的分子结构、靶标和功能。因而, 寄生蜂毒液也是重要的基因资源宝库, 在药物开发和杀虫蛋白筛选中将会发挥其潜在作用。本文主要就寄生蜂毒液蛋白组成、功能和进化, 对近期研究进行综述, 并探讨寄生蜂毒液研究中所采用的方法及应用前景, 尝试提出寄生蜂毒液研究中存在的问题及未来可能的发展方向。

关键词: 寄生蜂; 毒液; 组成; 功能; 进化

中图分类号: S476.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-9261(2017)01-0001-10

Research Advances on Composition, Function and Evolution of Venom Proteins in Parasitoid Wasps

YAN Zhichao, YE Xinhai, WANG Beibei, FANG Qi, YE Gongyin*

(Key Laboratory of Agricultural Entomology, Ministry of Agriculture/Institute of Insect Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: Parasitoid wasps are among the most abundant and diverse insects on earth. With diverse parasitic strategies and broad host ranges, they are important resources for biological control of pests. Venom is an essential parasitic factor, and shared by parasitoid wasps. For successful parasitism, venom is injected into the host to modulate host's behavior, immunity, development and metabolism. Parasitoid venom contains a lot of bioactive compounds with diverse molecular structures, targets and functions. Thus, parasitoid venom is recognized as a rich source for discovery of drugs and new insecticidal genes, and has a broad application prospect in both agriculture and medicine. This review focuses on recent research advances on composition, function and evolution of parasitoid venom, discusses the approaches used for venom study and their application prospects, and presents issues and future directions in study of parasitoid venom.

Key words: parasitoid wasp; venom; composition; function; evolution

寄生蜂是膜翅目寄生性昆虫, 其种类繁多, 已知有 10 万余种, 据估计可达 60 万余种^[1], 其多样性远超过其他带毒节肢动物, 如蜜蜂、蜘蛛、蝎子等。寄生蜂群体具有多种寄生策略, 寄主范围广泛, 占据了丰富多样的生态位, 是不可或缺的生态调节因子。按寄生位置不同, 寄生蜂可分为内寄生蜂和外寄生蜂^[2]; 按是否允许寄主继续发育, 可分为容性寄生蜂和抑性寄生蜂^[3,4]; 按所寄生的寄主发育阶段不同, 可分为卵期寄生蜂、幼虫期寄生蜂、蛹期寄生蜂和成虫期寄生蜂, 还有跨期寄生蜂^[3,4]。寄生蜂对其自然寄主、甚至非自然寄主的种群调控起到很大作用, 对生态稳定和多样性维持具有重要影响^[5]。同时, 寄生蜂也是重要的害虫天敌资源, 被广泛用于控制各种农业和卫生害虫, 在害虫生防领域中起到关键的作用^[2,6]。

基金项目: 国家自然科学基金 (31620103915, 31272098, 31472038)

作者简介: 严智超, 博士, E-mail: yan_zc@126.com; *通信作者, 教授, E-mail: chu@zju.edu.cn。

DOI: 10.16409/j.cnki.2095-039x.2017.01.001

毒液为寄生蜂所保守共有,是寄生蜂成功寄生的关键因子^[3]。寄生蜂毒液注入寄主,可用于协助多分DNA病毒(polydnavirus, PDV)或独立调控寄主的行为、免疫、发育和代谢等,最终使得寄生蜂成功寄生,且确保其后代顺利发育并完成世代^[2,6]。寄生蜂毒液在与寄主协同进化过程中,也产生了丰富的多样性,其中所含的活性蛋白具有丰富多样的分子结构、靶标和功能。因而,寄生蜂毒液与其他节肢动物如蜜蜂、蜘蛛、蝎子等一样,是重要的基因资源宝库,在药物开发和杀虫蛋白筛选中将会发挥其潜在作用^[7]。本文就寄生蜂毒液蛋白组成、功能和进化的近期研究进展作一概述,并就寄生蜂毒液研究中所采用的方法及应用前景、寄生蜂毒液研究中存在的问题及未来发展方向进行了探讨。

1 寄生蜂毒液蛋白组成

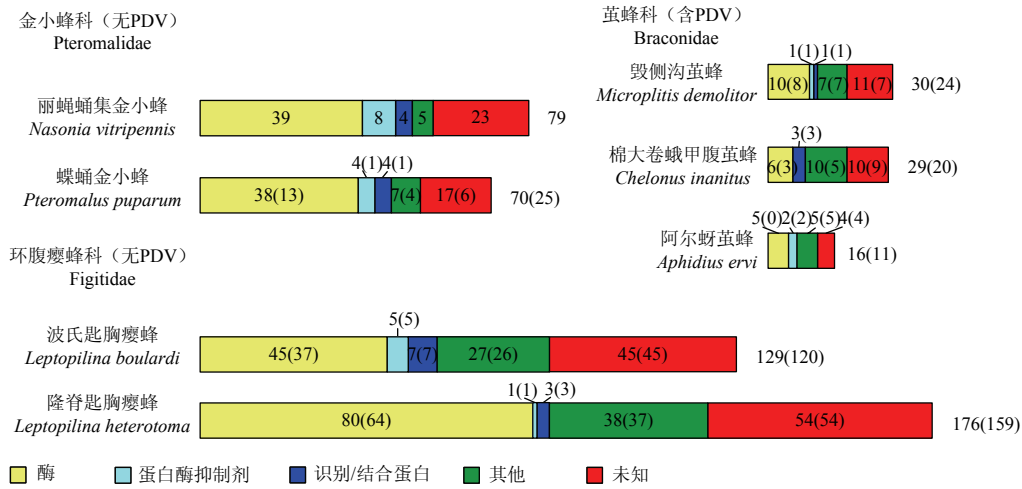
随着技术的发展,寄生蜂毒液蛋白组成的研究也在不断进步。Leluk等^[8]对25种膜翅目毒液进行SDS-PAGE分析比较,发现寄生蜂毒液蛋白组成与其他社会性膜翅目毒液有明显不同。社会性膜翅目昆虫如蜜蜂、蚂蚁,以及其他研究较多的带毒液节肢动物如蜘蛛、蝎子和蜈蚣等,其毒液主要组成为小肽,而寄生蜂毒液则以大分子蛋白为主,有些寄生蜂毒液中甚至缺乏20 kD以下的蛋白/小肽组分^[8]。此后,较早期的寄生蜂毒液组成研究常采用蛋白分离鉴定、cDNA文库筛选等方法^[9-11]。Parkinson等^[10,11]利用毒液蛋白分离后N端测序和毒腺cDNA文库筛选结合的方法,先后在寮黑瘤姬蜂*Pimpla hypochondriaca* (Retzius)中鉴定到19个毒液蛋白。Crawford等^[9]对阿牧草象筒爪茧蜂*Microctonus hyperodae* Loan采用毒腺cDNA文库测序,并对其中3条毒液蛋白主带进行质谱鉴定,共获得了8条毒液基因的全长。在蝶蛹金小蜂*Pteromalus puparum* (Linnaeus)中,Zhu等^[12,13]利用cDNA文库筛选,也获得了酸性磷酸酶、碱性磷酸酶等多个毒液蛋白序列。然而,不论是毒液分离鉴定还是cDNA文库筛选,通量都相对较低,并对一些低丰度的毒液蛋白缺乏鉴定能力。近期,随着高通量测序和蛋白质组技术的发展和普及,不少寄生蜂毒液组成研究采取了蛋白质组结合基因组或转录组的分析策略。de Graaf等^[14]基于丽蝇蛹集金小蜂*Nasonia vitripennis* (Walker)基因组信息,利用蛋白质质谱鉴定到79个毒液蛋白,其中16个毒液蛋白与其他已报道序列均没有序列相似性。另外,利用转录组和蛋白质组结合的方法,毒液蛋白组成相继在棉大卷蛾甲腹茧蜂*Chelonus inanitus* (Linnaeus)^[15]、波氏匙胸瘿蜂*Leptopilina boulardi* (Barbotin, Carton & Kelner-Pillault)^[16,17]、隆脊匙胸瘿蜂*L. heterotoma* (Thomson)、镶颞姬蜂*Hyposoter didymator* (Thunberg)、阿尔蚜茧蜂*Aphidius ervi* Haliday^[18,19]和蝶蛹金小蜂^[20]等中被解析(图1)。

总体而言,寄生蜂毒液蛋白组成较社会性膜翅目昆虫更为丰富。Leluk等^[8]通过SDS-PAGE分析发现,寄生蜂毒液蛋白较社会性膜翅目毒液具有更多的蛋白条带。de Graaf等^[14]也发现丽蝇蛹集金小蜂毒液蛋白的组成远比西方蜜蜂*Apis mellifera* Linnaeus的毒液组成要复杂。这可能是由于寄生蜂毒液与寄主协同进化过程中需要作用于更多寄主靶标。但寄生蜂在不同物种中的毒液数量也存在明显的差异。蝶蛹金小蜂和丽蝇蛹集金小蜂毒液各有70和79个蛋白质/肽^[14,20],波氏匙胸瘿蜂和隆脊匙胸瘿蜂各有129和176个^[17],而携带有多分DNA病毒PDV的棉大卷蛾甲腹茧蜂^[15]、毁侧沟茧蜂*Microplitis demolitor* Wilkinson^[21]和阿尔蚜茧蜂^[19]则各有30、29和16个(图1)。从这些结果可见,携带PDV的寄生蜂毒液蛋白数目和种类明显减少。这可能是由于PDV在一定程度上替代了毒液的功能,使毒液所需的种类和数目减少。但鉴于各个寄生蜂间采取的研究方法不尽相同,且样本量太少,仍不足以得出确切的结论。

从毒液蛋白组成来看,寄生蜂毒液呈现了丰富的多样性。不仅远缘物种间各个寄生蜂中均存在一些特异的未知毒液蛋白(图1),而且寄生蜂近缘物种间的毒液也存有较大差异^[16,17];即使是同一种寄生蜂,其毒液在不同种群间也存在多样性^[22]。从毒液蛋白的种类来看,有些蛋白种类似乎更倾向于在寄生蜂中进化为毒液蛋白,类似的现象在蜘蛛、海螺、蛇等毒液研究中也被发现。在寄生蜂中,大多数毒液蛋白为酶类,其次是半胱氨酸富集蛋白/肽如蛋白酶抑制剂、识别/结合蛋白等^[20](图1)。其中蛋白类别如丝氨酸蛋白酶、金属蛋白酶、酯酶(esterase)、钙网蛋白(calreticulin)、抗原蛋白(antigen)等为多种寄生蜂毒液所共有。

至今,寄生蜂毒液组成的研究虽已有一定的发展,但仍存在明显的不足。10万多种已报道的寄生蜂中,仅有不到20个物种的毒液组成被分析。另外,虽然寄生蜂毒液中以大蛋白为主,但不少研究结果表明寄

生蜂毒液中也存在小肽并起到重要的功能^[23,24]。而通常采用的蛋白质组鉴定方法，SDS—PAGE 无法有效截留毒液小肽，尤其当缺乏基因组信息时，毒液小肽十分容易被忽略。可见，寄生蜂毒液中的小肽组分仍有待进一步分析。



注：数字表示鉴定到的寄生蜂毒液蛋白总数或其在各蛋白分类中的数目。括号中的数字表示 BlastP (E-value<1e⁻⁵) 未比对到丽蝇蛹集金小蜂毒液蛋白的毒液蛋白数目。

Note: Numbers indicate numbers of identified venom proteins in each parasitoid wasp or protein category. Numbers in parenthesis indicate numbers of venom proteins without BlastP (E-value<1e⁻⁵) hits to *N. vitripennis* venom proteins.

图 1 七种代表性寄生蜂毒液蛋白种类和数目比较

Fig. 1 Comparison in categories and numbers of venom proteins among seven parasitoid species

2 寄生蜂毒液蛋白功能的研究

毒液是膜翅目昆虫所保守共有的，但其毒液功能却有一定的差别。社会性膜翅目毒液与其他节肢动物如蜘蛛、蝎子等类似，主要用于防御和捕食，其作用靶标主要集中在猎物的神经、肌肉、心血管系统等^[25]。而寄生蜂毒液随其卵一起注入寄主，为其后代在寄主体内存活发育，总体来说，除了调控寄主神经系统外，更需抑制寄主免疫，调节寄主发育，改变寄主代谢等，其功能与作用靶标显得尤为多样^[2,26-28]。

寄生蜂毒液的功能与寄生蜂种类及寄生策略密切相关。在不携带 PDV 的寄生蜂中，毒液起到了调控寄主的主要作用，而在携带 PDV 的寄生蜂中，毒液往往起到辅助增效作用，在一些姬蜂中，毒液甚至未见有明显功能^[29]。再如，抑性外寄生蜂毒液常具有神经毒性，可造成寄主发育停止甚至死亡。而容性内寄生蜂毒液则鲜有神经毒性，主要用于调控寄主免疫、发育和代谢等生理过程^[2,30]。

迄今，已有少数寄生蜂部分毒液蛋白的功能得到了解析。这些研究主要集中于金小蜂亚科的丽蝇蛹集金小蜂和蝶蛹金小蜂、寄生果蝇的匙胸瘦蜂 *Leptopilina* 和瘦蜂 *Ganaspis*，以及菜粉蝶微红绒茧蜂 *Cotesia rubecula* (Marshall)、阿尔蚜茧蜂、寮黑瘤姬蜂等几个代表物种 (表 1)。

菜粉蝶微红绒茧蜂毒液中的 Vn50 蛋白，通过与寄主酚氧化酶原 (prophenoloxidase, PPO)、酚氧化酶原激活蛋白 (prophenoloxidase-activating proteinase, PAP) 等互动，可以抑制寄主的 PPO 激活^[31]。波氏匙胸瘦蜂毒液中的丝氨酸蛋白酶抑制剂 (serpin) ^[32] 也被阐明可以抑制寄主 PPO 通路的激活，推测其潜在靶标为 PPO 通路上的某丝氨酸蛋白酶。而波氏匙胸瘦蜂中的另一毒液蛋白，超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) ^[33] 则可以直接抑制寄主的酚氧化酶 (prophenoloxidase, PO) 活性，从而协同抑制寄主的黑化反应。蝶蛹金小蜂和丽蝇蛹集金小蜂毒液中的 Pacifastin 和 Kazal 型蛋白酶抑制剂，被报道可以抑制寄主的 PPO 激活^[34-36]。通过 RNAi 的方法发现，丽蝇蛹集金小蜂毒液中的钙网蛋白也可能参与抑制了寄主黑化反应^[37]。

菜粉蝶微红绒茧蜂和蝶蛹金小蜂毒液中的钙网蛋白，均可抑制其共同寄主菜粉蝶 *Pieris rapae* Linnaeus 幼虫或蛹的血细胞的包裹反应^[38,39]。进一步的研究表明，蝶蛹金小蜂毒液中的钙网蛋白可以抑制寄主免疫相

表 1 已报道功能的寄生蜂毒液蛋白
Table 1 Parasitoid venom proteins with reported functions

功能类别	毒液蛋白	报道功能（报道物种）	采用研究方法
Functional categories	Venom proteins	Reported functions (species)	Methods
抑制寄主细胞免疫 Inhibit host cellular immunity	Calreticulin	抑制寄主血细胞延展、包裹 (<i>Cr</i> ^[38] , <i>Pp</i> ^[39])	试探性表达验证
	VPr1	削弱寄主血细胞的凝集反应 (<i>Ph</i> ^[44])	试探性表达验证
	Vpr3	削弱寄主血细胞的凝集反应 (<i>Ph</i> ^[43])	试探性表达验证
	RhoGAP	抑制寄主血细胞延展、包裹 (<i>Lb</i> ^[40])	活性追踪的分离鉴定
调控寄主体液免疫 Regulate host humoral immunity	SERCA	抑制寄主血细胞包裹反应 (<i>Gl</i> ^[45])	特异性抑制剂验证
	Vn50	抑制寄主 PPO 激活 (<i>Cr</i> ^[31])	活性追踪的分离鉴定
	Vn4.6	抑制寄主血淋巴黑化反应 (<i>Cr</i> ^[23])	活性追踪的分离鉴定
	Serpin	抑制寄主 PPO 激活 (<i>Lb</i> ^[32])	试探性表达验证
	Kazal	抑制寄主 PPO 激活 (<i>Nv</i> ^[35, 36] , <i>Pp</i> ^[34])	试探性表达验证
	Pacifastin	抑制寄主 PPO 激活 (<i>Pp</i> ^[34])	试探性表达验证
	Calreticulin	抑制寄主黑化反应 (<i>Nv</i> ^[37])	毒液 RNAi 结合 RNA 测序
	Defensin	抗菌 (<i>Nv</i> ^[48])	活性追踪的分离鉴定
	Chitinase	影响寄主几丁质代谢相关抗真菌基因表达 (<i>Nv</i> ^[49])	毒液 RNAi 结合 RNA 测序
	<i>Ep</i> MP3	延缓寄主发育 (<i>Ep</i> ^[47])	试探性表达验证
其他 Others	γ -GT	诱导寄主卵巢凋亡 (<i>Ae</i> ^[46])	活性追踪的分离鉴定
	Pimplin	麻痹寄主 (<i>Ph</i> ^[24])	活性追踪的分离鉴定
	Vn1.5	促进 PDV 基因的表达 (<i>Cr</i> ^[74])	活性追踪的分离鉴定

注 Note: VPr: 毒液蛋白 Venom protein; RhoGAP: Ras 同源 GTP 酶激活蛋白 Ras homologous GTPase activating protein; SERCA: 类肌浆网/内质网钙 ATP 酶 Sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase; *Ep*MP3: 长角姬小蜂金属蛋白酶 3 *Eulophus pennicornis* metalloproteinases 3; γ -GT: 伽玛谷胱甘肽转氨酶 γ -glutamyl transpeptidase; *Ae*: 阿尔蚜茧蜂 *Aphidius ervi*; *Cr*: 菜粉蝶微红绒茧蜂 *Cotesia rubecula*; *Ep*: 长角姬小蜂 *Eulophus pennicornis*; *Gl*: 瘿蜂 *Ganaspis* sp. 1; *Lb*: 波氏匙胸瘿蜂 *Leptopilina boulandi*; *Nv*: 丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis*; *Ph*: 寮黑瘤姬蜂 *Pimpla hypochondriaca*; *Pp*: 蝶蛹金小蜂 *Pteromalus puparum*

关基因的表达。而波氏匙胸瘿蜂毒液中的 RhoGAP (Ras homologous GTPase activating protein) 可与寄主的 RhoGAP 竞争性特异性结合, 抑制寄主血细胞的延展^[40,41]。寮黑瘤姬蜂毒液中的蛋白组分 VPr1 和 VPr3, 均可显著削弱寄主血细胞的凝集反应^[42-44]。果蝇寄生蜂 *Ganaspis* 中的类肌浆网/内质网钙 ATP 酶 (sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase, SERCA) 可以抑制寄主血细胞的钙流, 从而改变其黏附和包裹等行为^[45]。

阿尔蚜茧蜂毒液的谷胱甘肽转氨酶 (γ -glutamyl transpeptidase, γ -GT) 能使寄主蚜虫的卵巢凋亡, 起到去势的作用^[46]。寮黑瘤姬蜂毒液中的黑瘤姬蜂素 (pimplin) 可造成寄主麻痹^[24]。外寄生的长角姬小蜂 *Eulophus pennicornis* Nees von Esenbeck 毒液中的金属蛋白酶 *Ep*MP3 可延缓寄主的发育^[47]。菜粉蝶微红绒茧蜂毒液中的 Vn1.5 可以促进 PDV 基因的表达, 对 PDV 的活性有显著的增效作用。丽蝇蛹集金小蜂毒液中分离纯化出的防卫素 defensin 型抗菌肽, 可起到抑制革兰氏阴性菌的作用^[48]。通过 RNAi 干扰丽蝇蛹集金小蜂毒液中的几丁质酶 (chitinase), 结果表明寄主中包括几丁质代谢途径等的 9 个基因的表达发生了显著变化^[49]。

综上所述, 寄生蜂毒液蛋白功能的研究仍十分有限, 至今仍不到 50 个寄生蜂单一毒液蛋白功能被解析, 而机理研究更是严重缺乏。已有研究的功能也主要集中于抑制寄主免疫 (包括体液免疫和细胞免疫), 对于毒液蛋白调节寄主发育、生殖和神经系统的功能研究均为孤例, 对于何种毒液蛋白如何调控寄主营养代谢等尚缺乏研究 (表 1)。值得注意的是, 从已有的结果来看, 在不同的寄生蜂中往往采用不同的蛋白组分, 完成趋同的毒液功能。较明显的例子是, 不同寄生蜂利用各种毒液蛋白抑制寄主的黑化免疫反应。这表明进化过程中, 毒液蛋白可能被独立招募 (recruitment) 至毒液, 并独立进化出功能。另, 同源蛋白可能在不同物种毒液中进化出不同的功能。如钙网蛋白在菜粉蝶微红绒茧蜂和蝶蛹金小蜂中均可抑制寄主

的包裹反应^[38,39]。而在镶颚姬蜂中, 包含钙网蛋白的全毒液不存在抑制寄主血细胞包裹的功能^[29]。丽蝇蛹集金小蜂毒液 RNAi 试验则表明, 钙网蛋白在其毒液中可能与黑化相关^[37]。

3 寄生蜂毒液蛋白进化的研究

3.1 寄生蜂毒液蛋白的进化选择压力

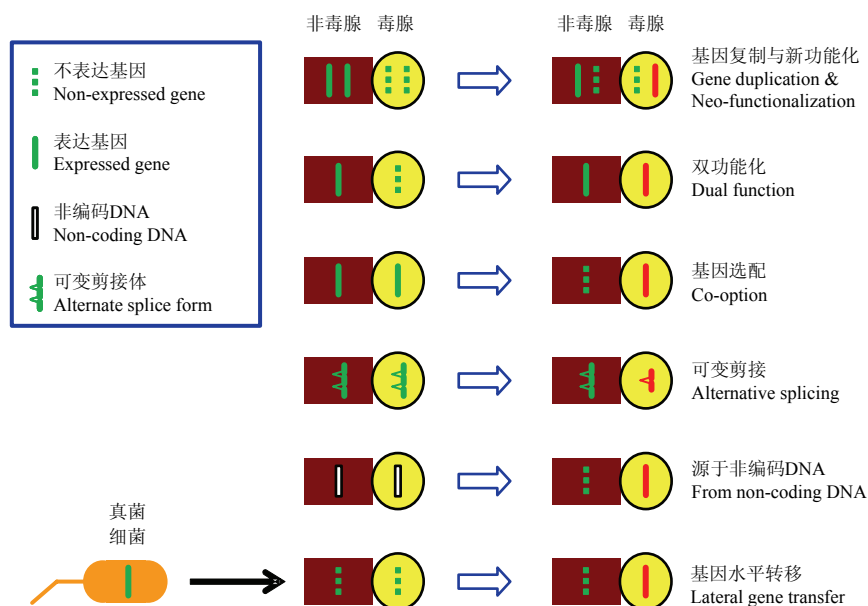
寄生蜂营拟寄生生活, 其后代攫取寄主营养, 并最终导致寄主死亡^[3]。一般情况下, 寄生后的寄生蜂后代和寄主最多只有一者存活下来, 或两者同时死亡。根据红桃皇后 (Red Queen) 假说, 寄生蜂与寄主在长期协同进化中存在激烈的“军备竞赛”, 只有不断地进化, 才能适应生存^[3]。而寄生蜂毒液与寄主的免疫、神经、发育和代谢等系统直接互作, 关系到最终的寄生成功与否, 因而寄生蜂毒液在进化中可能受到较大的选择压力。这主要表现为以下两个方面。

一方面, 毒液基因的进化速率更快。金小蜂 *Nasonia* 的基因组研究结果表明, 近源种丽蝇蛹集金小蜂和吉氏金小蜂 *N. giraulti* Darling 间, 毒液基因较之非毒液基因具有更高的异义替换速率与同义替换速率的比 (dN/dS), 这表明毒液基因相较于非毒液基因受到更多的选择压力^[50]。Martinson 等^[49]也发现小蜂总科中的毒液基因糖苷水解酶家族 19 (glycoside hydrolase family 19, GH19) 几丁质酶在金小蜂和掠蝇金小蜂 *Muscidifurax* 分支上呈现了强烈的正选择 (dN/dS > 1)。另一方面, 毒液基因获得和丢失的速率较快。在检测的 15 个小蜂总科物种中, GH19 几丁质酶基因只在其中 7 个物种的毒腺中表达。基于系统发育结果推测, 该基因在小蜂总科中发生了多次毒液基因获得或丢失事件^[16,49]。同时, 通过对果蝇内寄生蜂 *Leptopilina* 毒液组分的研究也发现寄生蜂毒液在种间和种内均存在高度的差异^[22]。例如, 波氏匙胸瘿蜂和隆脊匙胸瘿蜂之间没有共有的高丰度毒液组分^[16]。由此可推测毒液基因的获得和丢失可能存在较高的速率, 以适应与寄主激烈的竞争关系。然而, 寄生蜂毒液基因获得和丢失的具体速率仍缺乏系统的研究。

3.2 寄生蜂毒液蛋白基因的来源

进化过程中, 寄生蜂毒液组分获得了丰富的多样性, 其中毒液新基因的获得起到了重要的作用。然而, 寄生蜂毒液基因的来源至今也未有系统的研究。对蛇、锥心螺等毒液的研究发现, 毒液基因往往由基因复制产生并招募至毒液中, 最终特化出特异的毒液功能^[51]。寄生蜂可能也通过基因复制产生新的毒液基因。果蝇内寄生蜂波氏匙胸瘿蜂毒液中的 RhoGAP 由一个信号肽和一个 RhoGAP 结构域组成, 推测其可能来源于胞内的 RhoGAP^[40]。同时, 蛋白质组结果也发现该寄生蜂毒液中还存在其他 RhoGAP 类似的毒液蛋白, 但其关键的互作或酶解位点均已发生了突变^[17]。这表明这些毒液蛋白很可能来自于基因复制, 并伴随复制事件后的序列分化。阿尔蚜茧蜂毒液中的 γ -谷氨酰转肽酶 (γ -glutamyl transpeptidase) 也发现有类似的基因复制事件^[19]。Burke 和 Strand^[21]对毁殿沟茧蜂 *Microplitis demolitor* Wilkinson 的多种寄生因子进行分析, 发现 Ci-48a-like 和 reprodysin-like 基因家族发生了大量的复制事件, 并且部分基因被招募到毒液或畸形细胞中去。在毒液基因的招募过程中, 尤其基因复制源自非分泌型的非毒液基因, 信号肽的获得往往也是必需的。Moreau 和 Guillot^[7]对多种寄生蜂毒液蛋白的信号肽进行分析, 结果表明寄生蜂毒液信号肽具有经典的信号肽结构, 不符合 Jones 等^[52]提出的寄生蜂毒液信号肽具有特殊性的假设。

寄生蜂在适应不同寄主过程中也可能通过基因双功能化、已有非毒液基因的选配、可变剪接、基因水平转移和从非编码 DNA 的 *de novo* 生成等方法获得新的毒液基因^[30] (图 2)。基因水平转移在植物寄生线虫中比较常见, 而在营自由生活和动物寄生的线虫中较少。植物寄生线虫常通过基因水平转移获得新的唾液基因, 这可能与寄主适应性相关^[53,54]。在寄生蜂中, Martinson 等^[49]发现 GH19 几丁质酶基因由微孢子虫/兹壶菌水平转移至小蜂总科, 并被招募为具有活性的毒液蛋白, 调控寄主几丁质代谢相关基因的转录表达。可变剪接也是寄生蜂毒液的可能来源。果蝇寄生蜂 *Ganaspis* sp.1 中的 SERCA 基因有两个可变剪切, 一个在非毒腺中表达, 另一个则在毒腺中特异表达^[45]。另外, 寄生蜂毒液蛋白也可来源于已有非毒液基因的直接利用。如钙网蛋白是高度保守的看家基因, 在寄生蜂的各个组织均有表达, 但也被招募至毒液中, 并在多个寄生蜂毒液中均被检测到^[38,39]。此外, 各个寄生蜂中还有很多特异性的毒液基因, 与所有已知的序列没有同源性。这些毒液基因可能来源于基因的 *de novo* 生成, 但其具体的进化来源仍有待于进一步分析。



注：该图修改自 Mrinalini 等^[30]。

Note: This figure is revised from Mrinalini *et al.*^[30].

图 2 寄生蜂毒液进化的假设模型

Fig. 2 Proposed models of parasitoid venom evolution

3.3 寄生蜂毒液蛋白进化与寄生策略的关系

寄生蜂种类丰富多样，占据多种生态位，具有复杂多变的寄生策略^[3,55]。寄生蜂毒液与其寄生策略的关系，由于数据的严重缺乏，仍一无所知。寄生蜂毒液蛋白/肽组成变化是否与其寄主的转换有关？是否和寄生的寄主时期有关？寄主范围更广的寄生蜂毒液是否具有更多种类的毒液蛋白？在由外寄生向内寄生转化过程中，寄生蜂毒液组成发生了怎样的变化？这些问题仍有待进一步研究解答。

在内寄生蜂蝶蛹金小蜂和外寄生蜂丽蝇蛹集金小蜂毒液的初步比较研究中发现，前者的毒液与后者的毒液，而不是与其他已报道的内寄生蜂毒液，显示了更多的序列相似性^[20]。这一结果与内寄生蜂有不同独立起源的推测相一致，而蝶蛹金小蜂则是在金小蜂亚科中相对近期由外寄生向内寄生转化的物种^[20]。同时，内寄生的蝶蛹金小蜂较外寄生蜂的丽蝇蛹集金小蜂与其他内寄生蜂共有了更多的毒液蛋白种类。这些内寄生蜂所共有的毒液蛋白种类可能与内寄生化相关。

4 寄生蜂毒液的研究方法进展及前景

已有的寄生蜂毒液蛋白研究多采用基于活性追踪的分离鉴定或试探性表达验证的策略（表 1）。对于已知的全毒液功能，基于活性追踪的分离鉴定策略可追踪其功能活性，并进行分离纯化，最终鉴定其中活性组分。该研究策略清晰直接，菜粉蝶微红绒茧蜂毒液中的 Vn50^[31]、波氏匙胸瘿蜂毒液中的 RhoGAP^[40]、菜粉蝶微红绒茧蜂毒液中的 Vn1.5^[23]、阿尔蚜茧蜂毒液的 γ -谷氨酰转肽酶、寮黑瘤姬蜂毒液中的黑瘤姬蜂毒素^[24]和 VPr3^[42,43]等均采用该研究策略。但该策略也有明显的局限性，其主要受限于寄生蜂个体较小，且无法像蜜蜂一样用电击法等进行体外取毒，而复杂的毒液组成更加大了分离鉴定的难度^[14,56]。

另一研究策略是试探性表达验证，该策略往往通过序列同源性信息，预测毒液蛋白的功能，再进行表达验证。波氏匙胸瘿蜂毒液中的丝氨酸蛋白酶抑制剂^[32]，菜粉蝶微红绒茧蜂和蝶蛹金小蜂毒液中的钙网蛋白^[38,39]、寮黑瘤姬蜂毒液中的蛋白组分 VPr1^[44]等，均采用尝试性表达验证。该策略也有其明显的试错性和一定的盲目性。寄生蜂毒液具有丰富的多样性，即使是同样寄生果蝇的近缘寄生蜂波氏匙胸瘿蜂和隆脊匙胸瘿蜂，其毒液组分和作用机理也存有显著差异^[16,57]。这直接造成了不同寄生蜂毒液研究之间难以相互借鉴。另外，寄生蜂中多各自具有特异性的毒液蛋白，同源序列比对往往无法预测这些毒液蛋白的功能^[14]。

近期，RNAi 开始应用于寄生蜂毒液基因的研究，并已在丽蝇蛹集金小蜂中也取得了一定进展。RNAi

试验表明, 丽蝇蛹集金小蜂毒液中的钙网蛋白和几丁质酶分别在调控寄主黑化和几丁质代谢中具有潜在功能^[37,49]。但由于 RNAi 存在脱靶效应, 且毒液蛋白具有冗余性, 该技术也存在明显的缺陷和局限性。综上, 寄生蜂毒液的研究仍有待引入新的研究方法。

随着生物领域的蓬勃发展, 研究技术的不断革新, 生命科学研究将进入一个全新的高速发展阶段。寄生蜂毒液研究的发展也将在以下几个方面得到受益。

1) 组学技术的进步和普及。随着转录组、蛋白质组的应用和普及, 给寄生蜂毒液研究提供了部分之前无法获得的背景信息^[58-60]。随着基因组测序价格的降低和技术的不断进步, 尤其是第三代测序技术的应用, 将带动寄生蜂基因组测序和重测序的普及, 进一步丰富寄生蜂毒液的背景信息^[50,61]。同样, 转录组、蛋白质组技术的不断进步, 尤其是 *de novo* 蛋白质谱技术的发展^[62], 也将大大加快对寄生蜂毒液蛋白鉴定的步伐, 加深人们对寄生蜂毒液的理解。

2) 基因工程技术的应用与完善。锌指核酸酶 (zinc-finger nucleases, ZFN)、转录激活样效应因子核酸酶 (transcription activator-like effector nucleases, TALEN)、规律成簇的间隔短回文重复 (clustered regulatory interspaced short palindromic repeat, CRISPR) 等基因编辑技术的发展, 一方面使毒液基因敲除、敲入、沉默、过表达等成为可能, 将大大加快毒液蛋白功能的研究; 另一方面, 使毒液基因结合转基因技术的应用更为便捷, 可转入的选择对象也更为丰富^[63], 使寄生蜂毒液的研究和应用更为便捷。尤其是 CRISPR 技术, 具有高效的可操作性和广泛的适应性, 已被成功用于哺乳动物、农作物、昆虫、线虫、酵母等多种生物的基因编辑^[64], 并也已在丽蝇蛹集金小蜂中获得初步的成功, 其在毒液蛋白的研究及应用领域, 也将表现出巨大的潜力。

3) 高通量筛选等技术的发展和应用。高通量筛选技术的建立, 可以从多种候选毒液中快速筛选到含有所需有效组分的毒液, 并进一步从该毒液中分离到所需的活性组分^[65]。毒液蛋白高通量合成和表达技术、高通量结构解析技术等的发展, 也将大大加快寄生蜂毒液蛋白功能与结构的研究。

4) 微流控技术 (microfluidics) 能大大减少对样本量的需求, 适用于蛋白合成/表达、酶活分析、细胞分析、微量蛋白质组、单细胞转录组/基因组测序等多个研究领域^[66-69], 在生命科学研究中有着广阔的发展前景和巨大的应用潜力, 并尤其适用于寄生蜂毒液量少的特性。

5 寄生蜂毒液蛋白的应用研究进展

寄生蜂的物种多样性远远超过其他带毒节肢动物, 且毒液组成丰富, 功能与作用靶标多变^[70]。此外, 寄生蜂毒液蛋白在一般情况下不注入特异寄主之外的生物, 更不蛰刺人畜。其节肢动物寄主与高等脊椎动物存在明显的差异, 所以寄生蜂毒液蛋白是更绿色安全的杀虫蛋白候选资源。这些寄生蜂毒液活性蛋白可作为候选的杀虫基因导入昆虫病原物或作物中, 以增加昆虫病原物的杀虫效果或使作物获得抗虫性。同时, 也不排除部分寄生蜂毒液蛋白可通过保守的生物机制影响到人体反应, 从而用于新型药物合成开发的可能。如 Danneels 等^[71]发现丽蝇蛹集金小蜂毒液可以抑制 HEK293 细胞的 NF- κ B 通路。

然而, 相较于寄生蜂毒液蛋白的广阔应用前景, 其相关应用研究却十分稀少, 至今仅有一些其他寄生蜂寄生因子的应用研究。如 Rodriguez-Andres 等^[72]将毁侧沟茧蜂寄生因子 PDV 中的 Eglf1.0 蛋白转入塞姆利基森林病毒 (Semliki Forest virus) 中, 可以显著增强其对埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 的致死效果。Maiti 等^[73]将红足侧沟茧蜂 *Microplitis croceipes* Cresson 的畸形细胞分泌蛋白 TSP14 转入烟草, 可使烟草获得对烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* (Fabricius) 和烟草天蛾 *Manduca sexta* (Linnaeus) 的抗性。寄生蜂毒液应用研究稀少, 其主要原因可能与寄生蜂毒液组分功能等基础研究的进展有待突破相关。

6 结束语

寄生蜂种类繁多, 毒液蛋白/肽组成丰富, 作用靶标多样, 且相较于其他节肢动物毒液对脊椎动物更安全无害, 是发掘新型杀虫基因的资源宝库。寄生蜂毒液基因有望作为候选的杀虫基因用于抗虫转基因作物的培养和昆虫病原物的改造等, 以减少农药的使用。然而, 相较于其丰富的多样性和广阔的应用前景, 寄生蜂毒液蛋白的研究不论从组成、功能还是进化来看, 都十分有限, 应用方面的研究则更少。

随着对寄生蜂毒液的关注度不断增加,对其认识的不断加深,研究技术的不断发展,寄生蜂毒液的组分鉴定和功能研究将不断加快,其进化关系也将获得更详尽的解析。未来,我们相信越来越多的寄生蜂毒液蛋白将在农业甚至医学领域被开发利用,造福人类。

参 考 文 献

- [1] Heraty J. Parasitoid diversity and insect pest management[M]//Adler P H, Footitt R G, eds. Insect Biodiversity: Science and Society. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2009, 445-462.
- [2] Asgari S, Rivers D B. Venom proteins from endoparasitoid wasps and their role in host-parasite interactions[J]. Annual Review of Entomology, 2011, 56: 313-335.
- [3] Pennacchio F, Strand M R. Evolution of developmental strategies in parasitic Hymenoptera[J]. Annual Review of Entomology, 2006, 51: 233-258.
- [4] Whitfield J B. Phylogenetic insights into the evolution of parasitism in Hymenoptera[J]. Advances in Parasitology, 2003, 54: 69-100.
- [5] Condon M A, Scheffer S J, Lewis M L, et al. Lethal interactions between parasites and prey increase niche diversity in a tropical community[J]. Science, 2014, 343(6176): 1240-1244.
- [6] 朱家颖, 叶恭银, 胡萃. 寄生蜂毒液蛋白的研究进展[J]. 植物保护学报, 2008, 35(3): 270-278.
- [7] Moreau S J M, Guillot S. Advances and prospects on biosynthesis, structures and functions of venom proteins from parasitic wasps[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2005, 35(11): 1209-1223.
- [8] Leluk J, Schmidt J, Jones D. Comparative studies on the protein composition of hymenopteran venom reservoirs[J]. Toxicon, 1989, 27(1): 105-114.
- [9] Crawford A M, Brauning R, Smolenski G, et al. The constituents of *Microctonus* sp. parasitoid venoms[J]. Insect Molecular Biology, 2008, 17(3): 313-324.
- [10] Parkinson N, Richards E H, Conyers C, et al. Analysis of venom constituents from the parasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca* and cloning of a cDNA encoding a venom protein[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2002, 32(7): 729-735.
- [11] Parkinson N M, Conyers C, Keen J, et al. Towards a comprehensive view of the primary structure of venom proteins from the parasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2004, 34(6): 565-571.
- [12] Zhu J Y, Ye G Y, Fang Q, et al. Alkaline phosphatase from venom of the endoparasitoid wasp, *Pteromalus puparum*[J]. Journal of Insect Science, 2010, 10(1): 14.
- [13] Zhu J Y, Ye G Y, Hu C. Molecular cloning and characterization of acid phosphatase in venom of the endoparasitoid wasp *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae)[J]. Toxicon, 2008, 51(8): 1391-1399.
- [14] de Graaf D C, Aerts M, Brunain M, et al. Insights into the venom composition of the ectoparasitoid wasp *Nasonia vitripennis* from bioinformatic and proteomic studies[J]. Insect Molecular Biology, 2010, 19(S1): 11-26.
- [15] Vincent B, Kaeslin M, Roth T, et al. The venom composition of the parasitic wasp *Chelonus inanitus* resolved by combined expressed sequence tags analysis and proteomic approach[J]. BMC Genomics, 2010, 11(1): 693.
- [16] Colinet D, Deleury E, Anselme C, et al. Extensive inter- and intraspecific venom variation in closely related parasites targeting the same host: the case of *Leptopilina* parasitoids of *Drosophila*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2013, 43(7): 601-611.
- [17] Goecks J, Mortimer N T, Mobley J A, et al. Integrative approach reveals composition of endoparasitoid wasp venoms[J]. PLoS ONE, 2013, 8(5): e64125.
- [18] Nguyen T T A, Magnoli I, Cloutier C, et al. Early presence of an enolase in the oviposition injecta of the aphid parasitoid *Aphidius ervi* analyzed with chitosan beads as artificial hosts[J]. Journal of Insect Physiology, 2013, 59(1): 11-18.
- [19] Colinet D, Anselme C, Deleury E, et al. Identification of the main venom protein components of *Aphidius ervi*, a parasitoid wasp of the aphid model *Acyrthosiphon pisum*[J]. BMC Genomics, 2014, 15(1): 342.
- [20] Yan Z C, Fang Q, Wang L, et al. Insights into the venom composition and evolution of an endoparasitoid wasp by combining proteomic and transcriptomic analyses[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 19604.
- [21] Burke G R, Strand M R. Systematic analysis of a wasp parasitism arsenal[J]. Molecular Ecology, 2014, 23(4): 890-901.
- [22] Colinet D, Mathe-Hubert H, Allemand R, et al. Variability of venom components in immune suppressive parasitoid wasps: from a phylogenetic to a population approach[J]. Journal of Insect Physiology, 2013, 59(2): 205-212.
- [23] Asgari S, Zareie R, Zhang G, et al. Isolation and characterization of a novel venom protein from an endoparasitoid, *Cotesia rubecula* (Hym: Braconidae)[J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2003, 53(2): 92-100.
- [24] Parkinson N, Smith I, Audsley N, et al. Purification of pimplin, a paralytic heterodimeric polypeptide from venom of the parasitoid wasp *Pimpla*

- hypochondriaca*, and cloning of the cDNA encoding one of the subunits[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 32(12): 1769-1773.
- [25] Schwartz E F, Mourao C B, Moreira K G, *et al.* Arthropod venoms: a vast arsenal of insecticidal neuropeptides[J]. *Biopolymers*, 2012, 98(4): 385-405.
- [26] Zhu J Y, Ye G Y, Hu C. Venom of the endoparasitoid wasp *Pteromalus puparum*: an overview[J]. *Psyche*, 2011(3): 101-110.
- [27] 朱家颖, 叶恭银, 胡萃. 寄生蜂调控寄主分子机制的研究进展[J]. *植物保护学报*, 2008, 35(6): 564-568.
- [28] 时敏, 陈学新. 我国寄生蜂调控寄主生理的研究进展[J]. *中国生物防治学报*, 2015, 31(5): 620-637.
- [29] Doremus T, Urbach S, Jouan V, *et al.* Venom gland extract is not required for successful parasitism in the polydnavirus-associated endoparasitoid *Hyposoter didymator* (Hym. Ichneumonidae) despite the presence of numerous novel and conserved venom proteins[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2013, 43(3): 292-307.
- [30] Mrinalini, Werren J H. Parasitoid wasps and their venoms[M]//Gopalakrishnakone P, Malhotra A, eds. *Evolution of Venomous Animals and Their Toxins*. Netherlands: Springer, 2016, 1-26.
- [31] Asgari S, Zhang G M, Zareie R, *et al.* A serine proteinase homolog venom protein from an endoparasitoid wasp inhibits melanization of the host hemolymph[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 33(10): 1017-1024.
- [32] Colinet D, Dubuffet A, Cazes D, *et al.* A serpin from the parasitoid wasp *Leptopilina boulardi* targets the *Drosophila* phenoloxidase cascade[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2009, 33(5): 681-689.
- [33] Colinet D, Cazes D, Belghazi M, *et al.* Extracellular superoxide dismutase in insects: characterization, function, and interspecific variation in parasitoid wasp venom[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(46): 40110-40121.
- [34] 王磊. 蝶蛹金小蜂毒液蛋白质组与四个毒液蛋白生理功能的分析[D]. 浙江: 浙江大学, 2012.
- [35] 钱岑. 丽蝇蛹集金小蜂毒液蛋白组分的鉴定及 PACIFASTIN 类和 KAZAL 类基因的功能分析[D]. 浙江: 浙江大学, 2013.
- [36] Qian C, Fang Q, Wang L, *et al.* Molecular cloning and functional studies of two Kazal-type serine protease inhibitors specifically expressed by *Nasonia vitripennis* venom apparatus[J]. *Toxins (Basel)*, 2015, 7(8): 2888-2905.
- [37] Siebert A L, Wheeler D, Werren J H. A new approach for investigating venom function applied to venom calreticulin in a parasitoid wasp[J]. *Toxicon*, 2015, 107(Pt B): 304-316.
- [38] Zhang G M, Schmidt O, Asgari S. A calreticulin-like protein from endoparasitoid venom fluid is involved in host hemocyte inactivation[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2006, 30(9): 756-764.
- [39] Wang L, Fang Q, Qian C, *et al.* Inhibition of host cell encapsulation through inhibiting immune gene expression by the parasitic wasp venom calreticulin[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2013, 43(10): 936-946.
- [40] Labrosse C, Stasiak K, Lesobre J, *et al.* A RhoGAP protein as a main immune suppressive factor in the *Leptopilina boulardi* (Hymenoptera, Figitidae)-*Drosophila melanogaster* interaction[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 35(2): 93-103.
- [41] Colinet D, Schmitz A, Depoix D, *et al.* Convergent use of RhoGAP toxins by eukaryotic parasites and bacterial pathogens[J]. *PLoS Pathogens*, 2007, 3(12): e203.
- [42] Richards E H, Dani M P. Biochemical isolation of an insect haemocyte anti-aggregation protein from the venom of the endoparasitic wasp, *Pimpla hypochondriaca*, and identification of its gene[J]. *Journal of Insect Physiology*, 2008, 54(6): 1041-1049.
- [43] Dani M P, Richards E H. Cloning and expression of the gene for an insect haemocyte anti-aggregation protein (VPr3), from the venom of the endoparasitic wasp, *Pimpla hypochondriaca*[J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2009, 71(4): 191-204.
- [44] Richards E H, Bradish H, Dani M P, *et al.* Recombinant immunosuppressive protein from *Pimpla hypochondrica* venom (rvpr1) increases the susceptibility of mamestra brassicae larvae to the fungal biological control agent, *Beauveria bassiana*[J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2011, 78(3): 119-131.
- [45] Mortimer N T, Goecks J, Kacsoh B Z, *et al.* Parasitoid wasp venom SERCA regulates *Drosophila* calcium levels and inhibits cellular immunity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(23): 9427-9432.
- [46] Falabella P, Riviello L, Caccialupi P, *et al.* A γ -glutamyl transpeptidase of *Aphidius ervi* venom induces apoptosis in the ovaries of host aphids[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 37(5): 453-465.
- [47] Price D R G, Bell H A, Hinchliffe G, *et al.* A venom metalloproteinase from the parasitic wasp *Eulophus pennicornis* is toxic towards its host, tomato moth (*Lacanobia oleraceae*)[J]. *Insect Molecular Biology*, 2009, 18(2): 195-202.
- [48] Ye J L, Zhao H W, Wang H J, *et al.* A defensin antimicrobial peptide from the venoms of *Nasonia vitripennis*[J]. *Toxicon*, 2010, 56(1): 101-106.
- [49] Martinson E O, Martinson V G, Edwards R, *et al.* Laterally transferred gene recruited as a venom in parasitoid wasps[J]. *Molecular Biology and Evolution*,

- 2015, 33(4): 1042-1052.
- [50] Werren J H, Richards S, Desjardins C A, *et al.* Functional and evolutionary insights from the genomes of three parasitoid *Nasonia* species[J]. *Science*, 2010, 327(5963): 343-348.
- [51] Wong E S W, Belov K. Venom evolution through gene duplications[J]. *Gene*, 2012, 496(1): 1-7.
- [52] Jones D, Sawicki G, Wozniak M. Sequence, structure, and expression of a wasp venom protein with a negatively charged signal peptide and a novel repeating internal structure[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267(21): 14871-14878.
- [53] Haegeman A, Jones J T, Danchin E G. Horizontal gene transfer in nematodes: a catalyst for plant parasitism?[J]. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 2011, 24(8): 879-887.
- [54] Mitreva M, Smant G, Helder J. Role of horizontal gene transfer in the evolution of plant parasitism among nematodes[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2009, 532: 517-535.
- [55] Whitfield J B. Phylogeny and evolution of host-parasitoid interactions in Hymenoptera[J]. *Annual Review of Entomology*, 1998, 43: 129-151.
- [56] Wu M L, Ye G Y, Zhu J Y, *et al.* Isolation and characterization of an immunosuppressive protein from venom of the pupa-specific endoparasitoid *Pteromalus puparum*[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2008, 99(2): 186-191.
- [57] Schlenke T A, Morales J, Govind S, *et al.* Contrasting infection strategies in generalist and specialist wasp parasitoids of *Drosophila melanogaster*[J]. *PLoS Pathogens*, 2007, 3(10): 1486-1501.
- [58] dos Santos L D, Santos K S, Pinto J R A, *et al.* Profiling the proteome of the venom from the social wasp *Polybia paulista*: a clue to understand the envenoming mechanism[J]. *Journal of Proteome Research*, 2010, 9(8): 3867-3877.
- [59] Pinto J, Fox E G P, Saidenberg D M, *et al.* Proteomic view of the venom from the fire ant *Solenopsis invicta* Buren[J]. *Journal of Proteome Research*, 2012, 11(9): 4643-4653.
- [60] Yuan C H, Jin Q H, Tang X, *et al.* Proteomic and peptidomic characterization of the venom from the Chinese bird spider, *Ornithoctonus huwena* Wang[J]. *Journal of Proteome Research*, 2007, 6(7): 2792-2801.
- [61] Sanggaard K W, Bechsgaard J S, Fang X, *et al.* Spider genomes provide insight into composition and evolution of venom and silk[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 4590.
- [62] Seidler J, Zinn N, Boehm M E, *et al.* *De novo* sequencing of peptides by MS/MS[J]. *Proteomics*, 2010, 10(4): 634-649.
- [63] Gaj T, Gersbach C A, Barbas C F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering[J]. *Trends in Biotechnology*, 2013, 31(7): 397-405.
- [64] Pennisi E. The CRISPR craze[J]. *Science*, 2013, 341(6148): 833-836.
- [65] Vetter I, Davis J L, Rash L D, *et al.* Venomics: a new paradigm for natural products-based drug discovery[J]. *Amino Acids*, 2011, 40(1): 15-28.
- [66] Juang Y J, Chang J S. Applications of microfluidics in microalgae biotechnology: a review[J]. *Biotechnology Journal*, 2016, 11(3): 327-335.
- [67] Zhang J, Yan S, Yuan D, *et al.* Fundamentals and applications of inertial microfluidics: a review[J]. *Lab on a Chip*, 2016, 16(1): 10-34.
- [68] Du G, Fang Q, Den Toonder J M. Microfluidics for cell-based high throughput screening platforms: a review[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2016, 903: 36-50.
- [69] Reverte L, Prieto-Simon B, Campas M. New advances in electrochemical biosensors for the detection of toxins: nanomaterials, magnetic beads and microfluidics systems: a review[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2016, 908: 8-21.
- [70] Choi S J, Parent R, Guillaume C, *et al.* Isolation and characterization of Psalmopeotoxin I and II: two novel antimalarial peptides from the venom of the tarantula *Psalmopoeus cambridgei*[J]. *FEBS Letters*, 2004, 572(1-3): 109-117.
- [71] Danneels E L, Gerlo S, Heynink K, *et al.* How the venom from the ectoparasitoid wasp *Nasonia vitripennis* exhibits anti-inflammatory properties on mammalian cell lines[J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(5): e96825.
- [72] Rodriguez-Andres J, Rani S, Varjak M, *et al.* Phenoloxidase activity acts as a mosquito innate immune response against infection with Semliki forest virus[J]. *PLoS Pathogens*, 2012, 8(11): e1002977.
- [73] Maiti I B, Dey N, Pattanaik S, *et al.* Antibiosis-type insect resistance in transgenic plants expressing a teratocyte secretory protein (TSP14) gene from a hymenopteran endoparasite (*Microplitis croceipes*)[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2003, 1(3): 209-219.
- [74] Zhang G M, Schmidt O, Asgari S. A novel venom peptide from an endoparasitoid wasp is required for expression of polydnavirus genes in host hemocytes[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(40): 41580-41585.