

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2015.04.003

分子模拟技术及其在苹果蠹蛾代谢杀虫剂 分子机制研究中的应用进展

杨雪清^{1,2}, 刘吉元^{2,3}, 张雅林^{2*}

¹沈阳农业大学植物保护学院, 辽宁 沈阳 110866; ²西北农林科技大学植保资源利用与病虫害防治教育部重点实验室, 陕西 杨凌 712100; ³中国人民解放军第四军医大学药理学系药物化学教研室, 陕西 西安 710032

摘要: 苹果蠹蛾是世界性重要的果树害虫,也是我国一类进境检疫性有害生物,严重威胁着我国黄土高原和环渤海湾优势苹果产区的果业生产。化学防治是当前苹果蠹蛾防治最经济有效的措施,然而频繁使用化学杀虫剂引发的抗药性问题也在世界范围内相继报道。代谢抗性是苹果蠹蛾抗性中重要的机制,苹果蠹蛾解毒酶代谢杀虫剂的分子机制是当前代谢抗性研究的重点方向。基于分子模拟的方法在相关研究中扮演着越来越重要的角色,本文综述了分子模拟涉及的主要方法及其在苹果蠹蛾代谢杀虫剂分子机制研究中的应用,并展望未来可能的研究方向。

关键词: 苹果蠹蛾; 分子模拟; 解毒酶; 杀虫剂; 代谢抗性

Molecular simulation and its application progress on molecular metabolic mechanisms of insecticide in *Cydia pomonella*

Xue-qing YANG^{1,2}, Ji-yuan LIU^{2,3}, Ya-lin ZHANG^{2*}

¹College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866, China; ²Key Laboratory of Plant Protection Resources & Pest Management of Ministry of Education, College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; ³Department of Medicinal Chemistry and Pharmaceutical Analysis, the Fourth Military Medical University of the Chinese People's Liberation Army, Xi'an, Shaanxi 710032, China

Abstract: The codling moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) is a major global pest of pome fruits, and it was considered a serious invasive species, threatening the safety of fruit production areas in Loess Plateau and Bohai Bay. The effective management of the codling moth mainly depends on chemical insecticides. However, a major problem associated with chemical control of the codling moth is the development of insecticide-resistance worldwide. Among them, metabolic resistance is the main mechanism for *C. pomonella* resistance. To understand the metabolic mechanisms of insecticide resistance in *C. pomonella*, the molecular changes of detoxification enzymes were examined. Molecular simulation based methods can be important for such related research. This paper reviews the molecular simulation methods and its application in elucidating molecular metabolic mechanisms of insecticide resistance in *C. pomonella*. Future potential research directions using molecular simulation are put forward.

Key words: *Cydia pomonella*; molecular simulation; detoxifying enzyme; insecticide; metabolic resistance

苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* (L.) 属鳞翅目卷蛾科小卷蛾属,是世界性的果树重要害虫 (Fuentes-Contreras *et al.*, 2007; Reyes *et al.*, 2011; Voudouris *et al.*, 2011),也是我国重要的检疫性害虫之一。频繁使用化学杀虫剂使得苹果蠹蛾种群对各类化学杀虫剂产生了严重的抗药性 (Brun-Barale *et al.*, 2005; Reyes *et al.*, 2007; Yang & Zhang, 2015)。苹果蠹蛾对杀虫剂抗性的机理研究是近年来的研究热点,其中解毒代谢增强是苹果蠹蛾抗药性最普遍的机制 (Reyes *et al.*, 2007)。苹果蠹蛾中参与解毒

收稿日期 (Received): 2015-05-13 接受日期 (Accepted): 2015-06-07
基金项目: 国家公益性行业 (农业) 科研专项 (200903042); 国家自然科学基金 (31501666)
作者简介: 杨雪清, 男, 博士, 讲师。研究方向: 昆虫毒理与抗药性。E-mail: sling233@hotmail.com
* 通讯作者 (Author for correspondence), E-mail: yalinzh@nwsuaf.edu.cn

代谢的酶系包括多功能氧化酶(MFO)、谷胱甘肽转氨酶(GST)和羧酸酯酶(CarE)(Rodríguez *et al.*, 2011; Voudouris *et al.*, 2011)。然而目前从分子水平研究苹果蠹蛾解毒酶代谢杀虫剂分子机制的研究还相对较少。

当杀虫剂作用于昆虫后,靶蛋白、解毒酶以及杀虫剂分子之间必然存在着相互识别、相互反应和信息传递,并伴随着分子间的静电相互作用、范德瓦斯相互作用和疏水相互作用以及化学键的形成和断裂。然而,通过传统的试验手段研究上述反应过程中的每个步骤都十分困难。随着计算机技术、量子化学、生物信息学和结构生物学等研究学科的快速发展,使得利用分子模拟技术研究解毒酶—杀虫剂的相互作用、揭示代谢杀虫剂的分子机制以及杀虫剂的合理设计与改造和对解毒酶的定点突变改造成为了可能。分子模拟(Molecular simulation, MS)是以计算机技术为依托,以量子化学、统计力学为理论基础,对物理和化学过程中分子的微观行为进行仿真的一门新兴学科(陈正隆等, 2007; 吕玲红等, 2014)。

1 分子模拟方法

目前,分子模拟广泛应用于分子生物学中,用于认知、预测和模拟蛋白质、核酸的结构和性质,以及模拟DNA的双螺旋结构。分子模拟方法主要有量子力学方法(Quantum mechanics, QM)、分子力学方法(Molecular mechanics, MM)、分子动力学(Molecular dynamics, MD)和蒙特卡罗方法(Monte carlo, MC)(陈正隆等, 2007)。

2 分子模拟研究涉及的主要方法

2.1 同源建模

蛋白质的结构决定其功能。但要获得一个蛋白质准确的分子结构并不容易。在传统方法中,X-射线单晶衍射技术和核磁共振技术(NMR)是解析蛋白分子结构的经典方法,但前者需要将纯化的靶蛋白($>10\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)结晶,而许多蛋白质在如此高的表达量时容易形成包涵体,需要通过变/复性才能使蛋白质正确折叠;后者则要求靶蛋白在非常高的浓度下可溶、稳定、不聚集,且该技术难以解析大分子质量的蛋白质分子结构。此外,解析蛋白质分子结构费时费力,花费巨大(刘吉元, 2014)。

蛋白质三维结构预测是目前研究蛋白质结构信息的一个快速、有效、低廉的手段,包括从头预测法、比较模建法和折叠识别法(Cozzetto & Tramontano, 2005)。其中,比较模建法又称同源模建(Homology modeling),是目前最成熟、最常用的预测方法。Swiss model(Schwede *et al.*, 2003)和Modeller是目前最常用的免费同源构建工具。除此之外, Sybyl、Discovery Studio 和 MOE 等商业化软件也可用于同源模建。学者普遍认为,蛋白质在进化过程中三维结构的保守性远大于氨基酸序列的保守性。因此,当 2 个蛋白质氨基酸序列的一致性超过 30% 时,它们的三维结构高度一致。根据该理论,对于一个未知三维结构的蛋白质,只要在蛋白质晶体结构数据库(Protein data bank, PDB)中找到与其同源性较高、晶体结构的 R-factor 以及解析度较好的蛋白质,便能以该蛋白质的晶体结构为模板,构建未知蛋白质的三维结构模型(刘吉元, 2014)。对构建好的结构模型还需要进行结构优化和评估。目前常用的模型评估方法主要有拉氏分布图、Contact 曲线图、Profiles-3D 等(Luethy *et al.*, 1992)。同源模建过程见图 1。

2.2 分子对接

深入研究蛋白质(受体)与小分子(配体)的相互作用,需要获得准确的蛋白质—小分子复合物的空间结构。分子对接(Molecular docking)是分子模拟的重要方法之一,是预测蛋白质与小分子结合模式的重要手段。在受体—配体相互作用过程中,主要有 2 个学说,即“Lock and key”学说(也称“锁钥”学说)和“Induced fit”学说(又称“诱导契合”学说)。“锁钥学说”指的是,药物(配体)与蛋白质分子(受体)相互识别过程类似于钥匙与锁关系,这种识别关系认为受体与配体相互识别是刚性的几何结构匹配过程,只有当它们的立体结构互补才能结合。随着受体学说的发展, Koshland(1958)提出了“Induced fit”学说,他认为受体与配体的形状不一定是互补的,在受体与配体相互作用时,受体柔性的结合口袋会随着配体的诱导而发生构象上的变化,以达到最佳的互补性契合。通过分子对接确定复合物中的配体与受体的结合模式,研究它们之间关键的相互作用,为揭示配体的作用机制和设计新的配体提供了理论基础。目前,分子对接广泛应用于药物设计、材料设计等领域。

昆虫解毒酶并不是杀虫剂的作用靶标(受体),但许多杀虫剂与解毒酶结合得十分紧密,它们的 IC_{50} 甚至可达 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 级别 (Liu *et al.*, 2014; Prapanthadara *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2014)。因

此,利用分子对接研究解毒酶和杀虫剂的相互作用,已经成为研究害虫代谢杀虫剂分子机制的重要手段。

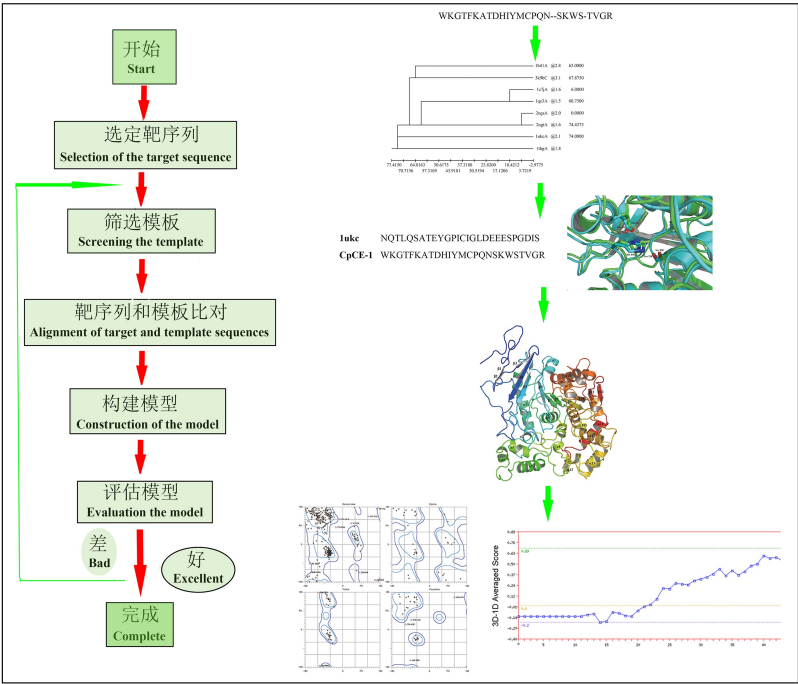


图 1 同源建模示意图(以 CpCE-1 为例)(引自 Yang *et al.*, 2014)
Fig.1 Schematic diagram of Homology modeling (a case study of CpCE-1) (quoted from Yang *et al.*, 2014)

随着受体学说的不断完善,分子对接模型从基于几何空间匹配的刚性模型发展成为基于几何空间匹配与能量匹配的柔性模型。几何空间匹配是蛋白质与配体之间产生相互作用的基础,能量匹配是分子间保持稳定结合的基础。各种分子对接方法对体系均有一定的简化,根据简化的程度和方式,可以将分子对接分为 3 类:刚性对接、半柔性对接和柔性对接。刚性对接是指在计算过程中,配体与受体的构像均不发生变化,适用于大分子之间的对接。该方法简化程度最高,计算量相对较小且粗略;半柔性对接是指对接过程中小分子的构像发生一定程度的变化,但大分子的构像保持不变或仅有部分氨基酸残基发生构象变化。半柔性对接在对接精确度和计算量方法采取了折中的策略,应用非常广泛,Dock 和 Autodock 是目前应用最为广泛的分子对接软件;柔性对接方法在对接过程中允许研究体系的构像发生自由变化,由于变量随着体系的原子数呈几何级数增长,因此柔性对接方法的计算量非常大,适合精确考察分子间的识别情况,应用有限,Accelrys 公司研发的 Affinity(Affinity, Accelrys

Inc.USA) 就是用于柔性对接的工具(刘吉元, 2014)。

2.3 分子动力学模拟

分子动力学模拟(Molecular dynamics simulations, MDS)是基于经典力学、模拟生物大分子运动行为的一种分子模拟方法。分子动力学模拟依靠牛顿力学模拟每个原子及体系的运动,计算体系中所有原子的运动轨迹,通过当前状态预测其在任意时刻的运动状态(刘吉元,2014)。分子动力学模拟的经典牛顿运动方程可表示为:

$$\vec{F}_i = m_i \vec{a}_i = m_i \frac{\partial^2 \vec{r}_i}{\partial t^2} = - \frac{\partial U(\vec{r}_i)}{\partial \vec{r}_i} \tag{1}$$

$$U(r_i) = \sum \frac{1}{2} k_{ij}^b (r_{ij} - r_{ij}^0)^2 + \sum \frac{1}{2} k_{ijk}^\theta (\theta_{ijk} - \theta_{ijk}^0)^2 + \sum \frac{1}{2} k_\xi (\xi_{ijkl} - \xi_{ijkl}^0)^2 + \sum k_\phi [1 + \cos(n\phi - \phi_0)] + r_{ij} \sum \left[\frac{C_{ij}^{12}}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_{ij}^6}{r_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r_{ij}} \right] \tag{2}$$

式中, $\vec{F}_i$ 表示所有其他原子作用到第 i 原子上

的合力, m_i 表示第 i 原子的质量, $\vec{a}_i$ 表示第 i 原子的加速度, $\vec{r}_i$ 是第 i 原子的位移矢量, $U(\vec{r}_i)$ 为体系势函数, k_{ij}^b 、 k_{ijk}^θ 、 k_ξ 、 k_ϕ 分别表示共价键的键能、键角能、非正常二面角能以及正常二面角能的力常数, C_{ij}^{12} 和 C_{ij}^6 代表范德瓦斯相互作用势的系数, q_i 和 q_j 分别代表第 i 和第 j 原子的电荷, r_{ij} 代表第 i 和第 j 原子之间的距离(刘吉元, 2014)。

常规的分子动力学模拟流程包括初始构型的确定、能量优化与体系缓慢升温(Heating)、平衡相(Equilibrium phase)和生产相(Production phase) 4 个阶段。

目前, AMBER 是进行分子动力学模拟最常用的分子力场。

2.4 结合自由能计算

受体和配体之间结合自由能(Binding free energy)是评价不同状态下复合物稳定性、描述分子间相互作用的核心问题数据。在配体和受体的相互作用过程中, 牵涉到 2 类相互作用, 即非键相互作用和共价相互作用。非键相互作用包括静电相互作用和范德瓦斯相互作用等, 这些相互作用都可以通过力场计算进行比较简单的表达; 而共价相互作用则牵涉到化学键的断裂和生成, 需要用量子力学的方法进行考察(刘吉元, 2014)。在药物分子和受体的相互作用时, 一般只牵涉到非键相互作用; 而共价相互作用只存在少数体系中。根据热力学原理, 结合自由能和结合常数 K_i 存在定量的关系(Ost *et al.*, 2004): $\Delta G = -RT \ln K_i$ 。

自由能的计算方法主要分为 3 类: 自由能微扰(Free energy perturbation, FEP)、热力学积分(Thermodynamic integration, TI)、基于主方程的分子力学/泊松—玻尔兹曼表面积方法(Molecular mechanics poisson-boltzmann surface area, MM-PBSA)(Chong *et al.*, 1999; Gohlke & Klebe, 2002; Marco *et al.*, 2005)。FEP 法在原理上比较严格, 计算结果也较为精确, 但需要长时间的数据采集, 对计算体系有严格的限制, 只能适合较为简单的情况; TI 法把结合自由能分解为不同的相互作用能量项, 通过一组训练集并利用统计方法得到自由能计算的经验公式, 取样简单, 计算量小, 但这类方法不能很好地考虑体系的柔性以及溶剂效应, 因此一般只能对一些体系做有限预测, 只能作为初筛的手段; MM-PBSA 法是近几年发展起来的基于分子动力学采样的

自由能预测方法, 该方法可用来计算配体与蛋白质受体复合物体系的绝对和相对结合自由能(Srinivasan *et al.*, 1998)。在此基础上还派生了分子力学/广义波恩表面积方法(Molecular mechanics generalized born surface area, MM-GBSA)(Kollman *et al.*, 2000)。MM-PBSA 和 MM-GBSA 这 2 种方法都是基于分子动力学采样, 不需要通过线性拟合而得到经验参数, 对不同体系具有较好的普适性, 计算速度快且结果较为准确, 已成为应用前景最为广阔的计算结合自由能的方法(刘吉元, 2014)。

3 分子模拟在苹果蠹蛾代谢抗性研究中的应用

近年来, 分子模拟技术在昆虫解毒酶与杀虫剂的相互作用中得到了一定程度的应用。利用同源模建, Li *et al.* (2004) 以芽孢杆菌 CYP102 为模板构建了棉铃虫 *Heliothis armigera* Hübner CYP6B1 和 CYP6B8 的 3D 模型, 并成功预测了棉铃虫 CYP6B1 和 CYP6B8 的活性口袋和参与催化的关键氨基酸。Chiu *et al.* (2008) 对冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* Giles CYP6Z1 和 CYP6Z2 的底物结合位点进行了比较, 并利用分子模拟方法分析了 CYP6Z1 和 CYP6Z2 与 DDT 的结合能力和对 DDT 的潜在代谢能力; 预测结果与代谢试验相吻合, 表明 CYP6Z1 能够代谢 DDT。Stevenson *et al.* (2011) 将溴氰菊酯与冈比亚按蚊 CYP6M2 进行了对接, 并发现溴氰菊酯结合于靠近亚铁血红素催化中心的 4'-苯氧基苄基。利用分子模拟和量子力学/分子力学(QM/MM)方法, Li *et al.* (2014) 预测并证实了在冈比亚按蚊 epsilon 家族的 agGSTe-2 中, Arg 112、Glu 116 和 Phe 120 对 DDT 的代谢至关重要。然而, 分子模拟技术在苹果蠹蛾代谢杀虫剂分子机制研究中的应用尚处于起步阶段。

3.1 在苹果蠹蛾 GSTs 代谢杀虫剂分子机制研究中的应用

近年来, 越来越多的昆虫 GSTs 蛋白晶体结构得到解析, 促使昆虫 GSTs 代谢杀虫剂分子机制的

研究进入了一个新的局面。Chen *et al.* (2003) 从 DDT 抗性冈比亚按蚊中解析了一个 δ 家族的 GST 蛋白 agGSTd1-6 的晶体结构 (PDB ID : 1pn9), 该蛋白由 8 个 α -螺旋和 4 个 β -折叠构成, 这是昆虫中第一个解析的 GST 晶体结构, 也拉开了昆虫 GSTs 蛋白结构研究和利用同源模建研究昆虫 GSTs 功能的序幕。此后, Kakuta *et al.* (2013) 解析了家蚕 GST 蛋白 bmGSTu 的晶体结构 (PDB ID : 3AY8), 并发现该蛋白中谷胱甘肽结合区域内的氨基酸残基 Val 55、Glu 67、Ser 68、Tyr 7 和 Ser 12 对 GST 的催化功能至关重要。

以 agGSTd1-6 晶体结构为模板, 利用同源模建技术, Liu *et al.* (2014) 构建了苹果蠹蛾 CpGST1 的三维结构。利用高效液相色谱检测, Liu *et al.* (2014) 发现原核表达的 CpGST1 蛋白能代谢高效氯氟氰菊酯, 但不能代谢甲基毒死蜱。CpGST1 活性位点包含 2 个亚位点, 即 GSH 结合位点 (G 位点) 和疏水性结合位点 (H 位点)。其中, G 位点由主要的亲水和极性的氨基酸残基 Ser 10、Gln 39、His 51、Thr 52、Val 53、Glu 65、Ser 66 和 Arg 67 组成; H 位点由疏水性的氨基酸残基 Val 7、Ala 11、Pro 12、Leu 34、His 35、Tyr 106、Phe 109、Tyr 114、Leu 117、Phe 118、Phe 205 和 Val 209 组成。通过分子对接发现, 高效氯氟氰菊酯的苯醚基团主要占据了蛋白活性位点中的 H 亚位点, 而其余基团与 G 位点中的氨基酸残基相互作用; 苯醚基团与 Val 7、Ala 11、Leu 34、Tyr 114、Phe 118、Phe 205 和 Val 209 之间具有较强的疏水作用, 三氟甲基上的氟原子与 Gln 50 具有极性作用。此外, 高效氯氟氰菊酯与 CpGST1 形成 2 对氢键, 包括羰基上的氧原子和 Thr 52 侧链的 OH 间形成的氢键 (1.7 Å) 以及氰基上的氮原子与 Val 53 间形成的另外一对氢键 (2.0 Å)。氢键网络好像“钳子”一样, 紧紧地将高效氯氟氰菊酯固定在 CpGST1 的活性区域。与高效氯氟氰菊酯不同的是, 甲基毒死蜱仅结合于活性位点中的 G 亚位点。甲基毒死蜱的三氯吡啶基团与 Thr 52 具有极性作用; 磷酸基团上的氧原子与 Ser 66 上的 NH 形成了一对氢键 (1.9 Å), 但带负电荷的 Glu 65 残基通过静电排斥, 使得磷酸基团与该氨基酸残基保持一定的距离 (图 2)。静电排斥作用降低了甲基毒死蜱与 CpGST1 的结合能力, 加之甲基毒死蜱-CpGST1 复合物中只存在一对氢键, 这就使得甲基

毒死蜱与 CpGST1 很难形成一个相对稳定的复合体。结合自由能计算表明, CpGST1-高效氯氟氰菊酯复合物的稳定性明显强于 CpGST1-甲基毒死蜱, 其结合自由能 ΔG_{bind} 分别为 -28.26 和 -16.08 kJ · mol⁻¹ (杨雪清, 2014; Liu *et al.*, 2014)。

3.2 在苹果蠹蛾 CarE 代谢杀虫剂分子机制研究中的应用

CarE 是昆虫体内含量最丰富的蛋白之一, 此类蛋白与含羧酸酯、酰胺酯、硫酸酯等基团的内源或外源物质的代谢有关 (Birner-Gruenberger *et al.*, 2012), 还与昆虫的生长发育、生殖等重要行为有关 (李永强, 2012)。

为从结构上研究 CarE 与杀虫剂的相互作用, 进而揭示 CarE 代谢杀虫剂的分子机制, Jackson *et al.* (2013) 解析了铜绿蝇 *Lucilia cuprina* (Wied.) 羧酸酯酶 LcαE7 的晶体结构, 这为利用同源模建等分子模拟技术在其他昆虫中开展 CarE 代谢含酯类键化合物的分子机制研究奠定了基础。但在此之前, CarE 晶体结构在昆虫中尚未见报道。

Yang *et al.* (2014) 利用同源模建, 选择了与 CpCE-1 氨基酸序列一致性高达 38% 的黑曲霉 *Aspergillus niger* EstA (PDB : 1ukc : A) 为模板, 构建了 CpCE-1 的三维模型; 在此基础上进行分子对接、分子动力学模拟和计算丙氨酸扫描。研究表明, CpCE-1 (GenBank 登录号: KC832922) 中 Asn 233 残基在 CpCE-1 与乙酰甲胺磷作用中的能量贡献近乎于热点“Hot-spot” (Moreira *et al.*, 2007), 突变为丙氨酸 Ala 后, 模拟的结合自由能差值 ΔG_{bind} 为 3.66 kcal · mol⁻¹; 乙酰甲胺磷对野生型 CpCE-1 的抑制中浓度 IC_{50} 值为 42.18 μmol · L⁻¹, 而对 N232A 突变体的 IC_{50} 值高于 10000 μmol · L⁻¹; 计算得到的 N232A 结合自由能差值 ΔG_{bind} 为 3.17 kcal · mol⁻¹, 与计算机模拟值接近; 代谢试验表明野生型 CpCE-1 能够代谢乙酰甲胺磷, 而 N232A 不能代谢乙酰甲胺磷, 表明 Asn 232 是与乙酰甲胺磷结合和代谢的关键氨基酸残基。N232A 突变后, “烟斗状”的活性口袋基本构象并没有发生明显的改变, 蛋白的正确折叠也没有受到影响, 说明 N232A 突变对酶活性无影响, 但 N232A 突变使得 CpCE-1 产生了一个向里延伸的空洞 (图 3), 这或许是 N232A 突变体难以结合和代谢乙酰甲胺磷的原因。

在其他昆虫中, CarE 发生 A/G137D 和 W251L/S(A/G137 和 W251 分别对应 CpCE-1 中的 A121 和 W233) 突变是昆虫对有机磷杀虫剂产生抗性的普遍机制 (Cui *et al.*, 2011; Newcomb *et al.*, 1997), 而这个与乙酰甲胺磷结合和代谢的关键氨基酸 Asn 232 残基在其他抗性昆虫种群中均未被报道。通过对采自甘肃武威、法国、德国卡尔斯鲁厄、瑞士库尔、澳大利亚、白俄罗斯明斯克、意大利莫利

塞 7 个地理种群的苹果蠹蛾成虫样本的 CpCE-1 基因第 122、232、233 位氨基酸残基进行突变检测, 结果表明, 233 位点发生 N232T 和 N232A 的频率分别为 20% 和 30% (Yang *et al.*, 2014), 表明 Asn 232 与乙酰甲胺磷的代谢密切相关, 而该位点发生突变可能与苹果蠹蛾对乙酰甲胺磷潜在抗性的形成有关 (刘吉元, 2014; 杨雪清, 2014)。

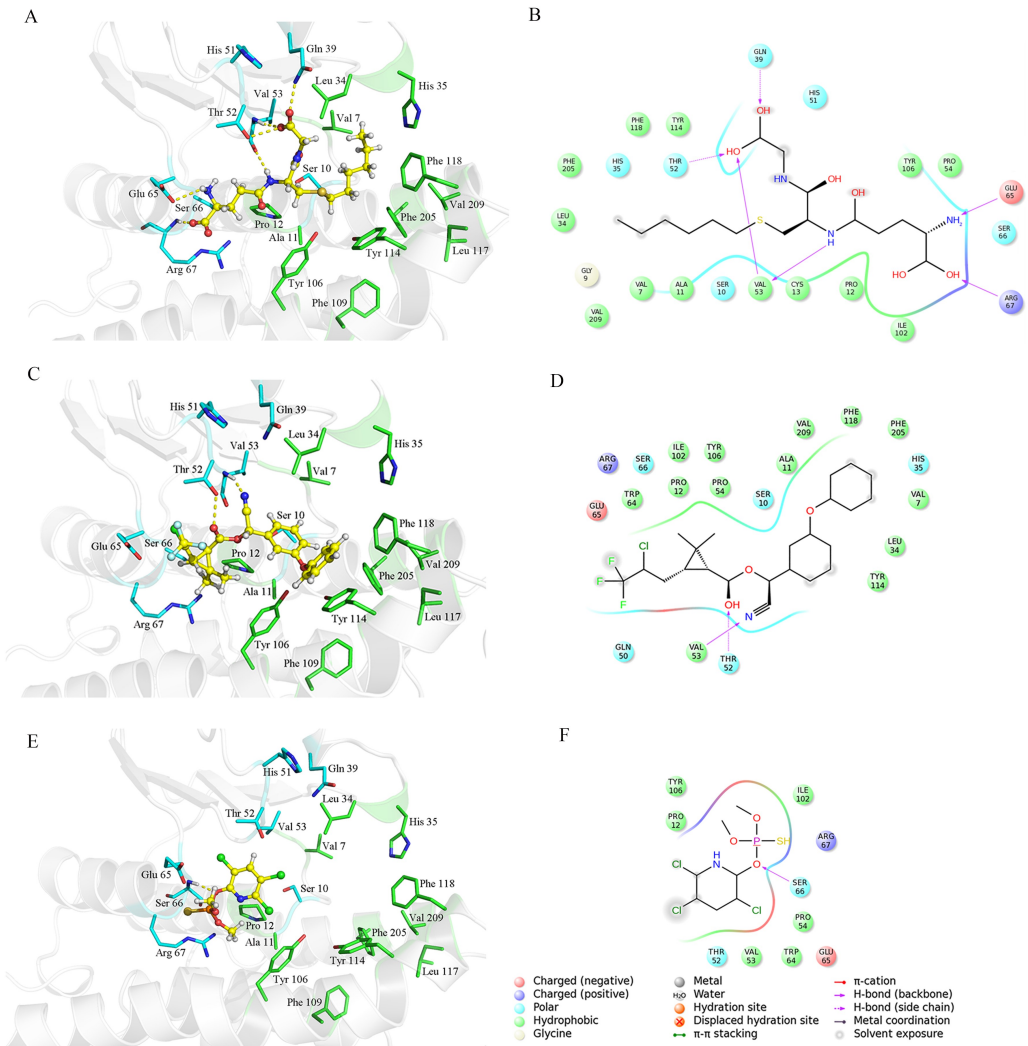


图 2 3 个分子与 CpGST1 结合位点示意图(引自 Liu *et al.*, 2014)

Fig.2 The schematic representation of the CpGST1 3D model around all of the substrates' binding site(quoted from Liu *et al.*, 2014)
抑制剂 GTX 与 CpGST1 结合模式(A) 和作用网络(B); 高效氯氟氰菊酯与 CpGST1 结合模式(C) 和作用网络(D);
甲基毒死蜱与 CpGST1 结合模式(E) 和作用网络(F)。黄色虚线表示氨基酸残基与小分子基团形成的氢键。

The binding model (A) and interaction diagram (B) of GTX with CpGST1. The binding model (C) and interaction diagram (D) of lambda-cyhalothrin with CpGST1. The binding model (E) and interaction diagram (F) of chlorpyrifos-methyl with CpGST1.

The yellow dotted lines show hydrogen bonds among the atoms for the key residues and the substrates.

有关苹果蠹蛾代谢杀虫剂分子机制的研究相对较少。除上述研究外, Yang *et al.* (2013) 还克隆了一个苹果蠹蛾 P450 基因 CYP9A61, 并对其时空

表达模式和杀虫剂诱导表达模式进行了研究。研究表明, CYP9A61 可能与高效氯氟氰菊酯的代谢相关 (Yang *et al.*, 2013); 啉虫脒对苹果蠹蛾 3 龄

幼虫有较好的胃毒活性,其 IC_{50} 值为 $3.16\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 但亚致死剂量的啉虫脒对解毒酶 *CYP9A61*、*CpGST1* 及 *CpCE-1* 基因表达量无明显影响 (Yang *et al.*, 2015); 亚致死剂量的乙基毒死蜱和高效氯氟氰菊酯能显著诱导苹果蠹蛾 *CpCE-1* 基因表达上调, 并抑制异源表达的 *CpCE-1* 蛋白羧酸酯酶活性 (Yang,

2015)。为进一步阐述解毒酶基因在杀虫剂代谢和潜在抗性形成方面的作用, 分子模拟是阐释解毒酶与杀虫剂相互作用的强有力的方法。上述研究表明, 分子模拟与生物学试验相结合是研究昆虫解毒酶与杀虫剂相互作用的可靠方法, 为深入研究昆虫解毒酶对杀虫剂代谢分子机制提供了理论保障。

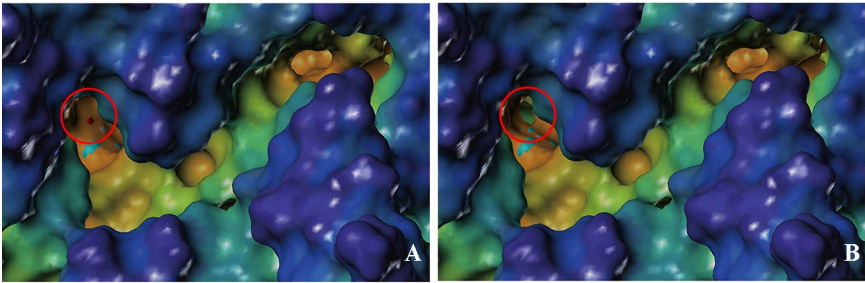


图 3 抗原表位图 (引自 Yang *et al.*, 2014)
Fig.3 Cavity depth potential surface of the wild CpCE-1 and N232A (quoted from Yang *et al.*, 2014)
A: 野生型 Wild CpCE-1; B: N232A 突变体 Mutant N232A.

4 展望

随着计算机技术、量子化学和统计力学的发展, 分子模拟技术在蛋白质的结构和功能研究方面的应用将越来越广泛。仅靠传统的试验方法难以揭示所研究的科学问题的机制, 联合分子模拟和其他方法已成为现今研究的主流。当然, 基于蛋白质序列的分子模拟, 可能忽视了活体细胞中的修饰对其构型的影响, 使得结果不够可靠。随着相关理论和技术的不完善和发展, 分子模拟的准确度越来越高, 已成为蛋白质功能研究中强有力的工具。分子模拟技术应用最广、最有发展前景的领域是药物开发和设计。虽然目前分子模拟技术在昆虫学研究中的应用尚处在起步阶段, 但随着人们对分子模拟技术认识的逐步深入, 以及对利用计算机科学、生物信息学、统计力学等多学科联合探究生物学问题的意识的增强, 分子模拟将在苹果蠹蛾等昆虫代谢杀虫剂分子机制研究中, 以及抗性机制的阐释和基于受体结构的新杀虫剂的设计、具有杀虫剂残留去除功能的昆虫源工程菌的开发等方面研究中发挥巨大作用。

参考文献

陈正隆, 徐为人, 汤立达. 2007. 分子模拟的理论与实践. 北京: 化学工业出版社.
李永强. 2012. 棉铃虫羧酸酯酶表达及解毒作用研究. 杨凌: 西北农林科技大学.
刘吉元. 2014. 蛋白质与配体相互作用分子模拟研究. 杨凌:

西北农林科技大学.
吕玲红, 陆小华, 刘维佳, 朱育丹. 2014. 分子模拟在化学工程中的应用. 化学反应工程与工艺, 30(3): 193–202.
杨雪清. 2014. 苹果蠹蛾解毒酶基因的克隆及功能研究. 杨凌: 西北农林科技大学.
Birner-Gruenberger R, Bickmeyer I, Lange J, Hehlert P, Hermetter A, Kollroser M, Recberger G N and Kühnlein R P. 2012. Functional fat body proteomics and gene targeting reveal in vivo functions of *Drosophila melanogaster* α -Esterase-7. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42: 220–229.
Brun-Barale A, Bouvie J C, Pauron D, Bergé J B and Sauphanor B. 2005. Involvement of a sodium channel mutation in pyrethroid resistance in *Cydia pomonella* L. and development of a diagnostic test. *Pest Management Science*, 61: 549–554.
Chen L, Hall P R, Zhou X E, Ranson H, Hemingway J and Meehan E J. 2003. Structure of an insect δ -class glutathione S-transferase from a DDT-resistant strain of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 59: 2211–2217.
Chiu T L, Wen Z, Rupasinghe S G and Schuler M A. 2008. Comparative molecular modeling of *Anopheles gambiae* CYP6Z1, a mosquito P450 capable of metabolizing DDT. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 8855–8860.
Chong L T, Duan Y, Wang L, Massoval I and Kollman P A. 1999. Molecular dynamics and free-energy calculations applied to affinity maturation in antibody 48G7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 14330–14335.

- Cozzetto D and Tramontano A. 2005. Relationship between multiple sequence alignments and quality of protein comparative models. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 58: 151–157.
- Cui F, Lin Z, Wang H, Liu S, Chang H, Reeck G, Qiao C, Ray M and Kang L. 2011. Two single mutations commonly cause qualitative change of nonspecific carboxylesterases in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41: 1–8.
- Fuentes-Contreras E, Reyes M, Barros W and Sauphanor B. 2007. Evaluation of azinphos-methyl resistance and activity of detoxifying enzymes in codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) from central Chile. *Journal of Economic Entomology*, 100: 551–556.
- Gohlke H and Klebe G. 2002. Approaches to the description and prediction of the binding affinity of small-molecule ligands to macromolecular receptors. *Angewandte Chemie International Edition*, 41: 2644–2676.
- Jackson C J, Liu J W, Carr P D, Younus F, Coppin C, Meirelles T, Lethier M, Pandey G, Ollis D L, Russell R J, Weik M and Oakeshott J G. 2013. Structure and function of an insect α -carboxylesterase (α Esterase7) associated with insecticide resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110: 10177–10182.
- Kakuta Y, Usuda K, Nakashima T, Kimura M, Aso Y and Yamamoto K. 2013. Crystallographic survey of active sites of an unclassified glutathione transferase from *Bombyx mori*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1810: 1355–1360.
- Kollman P A, Massova I, Reyes C, Kuhn B, Huo S, Chong L, Lee M, Lee T, Duan Y, Wang W, Donini O, Cieplak P, Srinivasan J, Case D A and Cheatham T E. 2000. Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models. *Accounts of Chemical Research*, 33: 889–897.
- Koshland D E. 1958. Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 44: 98.
- Li X C, Baudry J, Berenbaum M R and Schuler M A. 2004. Structural and functional divergence of insect CYP6B proteins: From specialist to generalist cytochrome P450. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 2939–2944.
- Li Y, Shi X, Zhang Q, Hu J, Chen J and Wang W. 2014. Computational evidence for the detoxifying mechanism of epsilon class glutathione transferase toward the insecticide DDT. *Environmental Science & Technology*, 48: 5008–5016.
- Liu J Y, Yang X Q and Zhang Y L. 2014. Characterization of lambda-cyhalothrin metabolizing glutathione S-transferase GST1 from *Cydia pomonella* (L.). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98: 8947–8962.
- Luethy R, Bowie J U and Eisenberg D. 1992. A common cross-species function for the double epidermal growth factor-like modules of the highly divergent *Plasmodium* surface proteins MSP-1 and MSP-8. *Nature*, 356: 83–85.
- Marco E, Negri A, Luque F J and Gago F. 2005. Role of stacking interactions in the binding sequence preferences of DNA bis-intercalators: insight from thermodynamic integration free energy simulations. *Nucleic Acids Research*, 33: 6214–6224.
- Moreira I S, Fernandes P A and Ramos M J. 2007. Computational alanine scanning mutagenesis — An improved methodological approach. *Journal of Computational Chemistry*, 28: 644–654.
- Newcomb R D, Campbell P M, Ollis D L, Cheah E, Russell R J and Oakeshott J G. 1997. A single amino acid substitution converts a carboxylesterase to an organophosphorus hydrolase and confers insecticide resistance on a blowfly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94: 7464–7468.
- Ost T W B, Clark J P, Anderson J L R, Yellowlees L J, Daff S and Chapman S K. 2004. 4-Cyanopyridine, a versatile spectroscopic probe for cytochrome P450 BM3. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 48876–48882.
- Prapanthadara L, Ranson H, Somboon P and Hemingway J. 1998. Cloning, expression and characterization of an insect class I glutathione S-transferase from *Anopheles dirus* species B. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 28: 321–329.
- Reyes M, Collange B, Rault M, Casanelli S and Sauphanor B. 2011. Combined detoxification mechanisms and target mutation fail to confer a high level of resistance to organophosphates in *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99: 25–32.
- Reyes M, Frank P, Charmillot P J, Ioriatti C, Olivares J, Pasqualini E and Sauphanor B. 2007. Diversity of insecticide resistance mechanisms and spectrum in European populations of codling moth, *Cydia pomonella*. *Pest Management Science*, 63: 890–902.
- Rodríguez M A, Marques T, Bosch D and Avilla J. 2011. Assessment of insecticide resistance in eggs and neonate larvae of *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 100: 151–159.
- Schwede T, Kopp J, Guex N and Peitsch M C. 2003. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server.

- Nucleic Acids Research*, 31: 3381–3385.
- Srinivasan J, Cheatham T E, Cieplak P, Kollman P A and Case D A. 1998. Continuum solvent studies of the stability of DNA, RNA, and phosphoramidate-DNA helices. *Journal of the American Chemical Society*, 120: 9401–9409.
- Stevenson B J, Bibby J, Pignatelli P, Muangnoicharoen S, O' Neill P M, Lian L Y, Müller P, Nikou D, Steven A, Hemingway J, Sutcliffe M J and Paine M J I. 2011. Cytochrome P450 6M2 from the malaria vector *Anopheles gambiae* metabolizes pyrethroids: Sequential metabolism of deltamethrin revealed. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41: 492–502.
- Voudouris C C, Sauphanor B, Frank P, Reyes M, Mamuris Z, Tsitsipis J A, Vontas J and Margaritopoulos J T. 2011. Insecticide resistance status of the codling moth *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) from Greece. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 100: 229–238.
- Yang X Q. 2015. Gene expression analysis and enzyme assay reveal a potential role of the *Carboxylesterase* gene *CpCE-1* from *Cydia pomonella* in detoxification of insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, DOI: 10.1016/j.pestbp.2015.10.018.
- Yang X Q, Li X C and Zhang Y L. 2013. Molecular cloning and expression of *CYP9A61*: a chlorpyrifos-ethyl and lambda-cyhalothrin-inducible cytochrome P450 cDNA from *Cydia pomonella*. *International Journal of Molecular Sciences*, 14: 24211–24229.
- Yang X Q, Liu J Y, Li X C, Chen M H and Zhang Y L. 2014. Key amino acid associated with acephate detoxification by *Cydia pomonella* carboxylesterases based on molecular dynamics with alanine scanning and site-directed mutagenesis. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 54: 1350–1370.
- Yang X Q, Wu Z W, Zhang Y L and Barros-Parada B. 2015. Toxicity of six insecticides on codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) and effect on expression of detoxification genes. *Journal of Economic Entomology*, DOI: 10.1093/jee/fov297.
- Yang X Q and Zhang Y L. 2015. Investigation of insecticide-resistance status of *Cydia pomonella* in Chinese populations. *Bulletin of Entomological Research*, 105: 316–325.

(责任编辑:郭莹)

