

文章编号:1674-2869(2013)08-0013-06

蜜蜂与桃蚜烟碱乙酰胆碱受体同源模建与对接

巨修练,李 科,王黎丽

(武汉工程大学化工与制药学院,绿色化工过程省部教育部重点实验室,湖北 武汉 430074)

摘 要:为了探究使用吡虫啉对蜜蜂造成伤害的成因,以“静水椎实螺”的烟碱乙酰结合蛋白与吡虫啉的共晶化合物作为模板,使用分子模拟技术得到蜜蜂和桃蚜烟碱乙酰胆碱受体.通过拉氏图和分子动力学模拟等实验方法验证了受体的可靠性和合理性.将新烟碱类化合物吡虫啉分别与模建受体对接,所得到的结合自由能和对接位点与生物学实验数据和位点突变结果相吻合.吡虫啉分别与蜜蜂、桃蚜烟碱乙酰胆碱受体分子对接结果显示,吡虫啉与蜜蜂、桃蚜烟碱乙酰胆碱受体对接的结合自由能最高值分别为 $-9.592\ 4$ 千卡/摩尔和 $-7.124\ 1$ 千卡/摩尔,说明该药物对蜜蜂、桃蚜具有同等效力的毒性.吡虫啉的硝基部分在对接中起到了关键作用,在蜜蜂受体中其与阿尔法亚基发生相互作用,而在桃蚜受体中主要与贝塔亚基结合.证明了吡虫啉的使用确实危害到了蜜蜂群体的生存.

关键词:烟碱乙酰胆碱受体;蜜蜂;桃蚜;吡虫啉;同源模建

中图分类号:R914.2

文献标识码:A

doi:10.3969/j.issn.1674-2869.2013.08.003

0 引 言

农药在现代农业生产中具有举足轻重的作用,是农业稳产增产不可或缺的保障,在防治病虫害方面发挥着重要作用^[1].新烟碱类杀虫剂自问世以来,已成为农药市场占有率最高的杀虫剂类型之一;其中的大部分品种具有对多种抗性害虫显示出了较好的杀伤性,同时对哺乳动物较为安全的特性.吡虫啉是市场占有率最高的新烟碱类化合物,我国自 1992 年起便一直着手于对吡虫啉的使用进行深入研究^[2].如今,我国市场上共有 60 多种以吡虫啉为主要成分的农药商品销售.虽然 20 多年来,吡虫啉在我国农业发展上做出了突出的贡献,但其危害性也是不容忽视的,尤其是近十多年来,吡虫啉对蜜蜂造成伤害的报告屡见不鲜^[3].几百年来,由于具有对环境友好,产蜜量高,传花授粉等特性,蜜蜂被广泛饲养于世界各地.从这个角度看,该物种的基因差异性要远远低于其它昆虫,其对毒性化合物的反应结果也应相对稳定.但近些年来,全球各地陆续报道了吡虫啉对蜜蜂产生杀伤的报道,其中最早的报告来自于法国.本世纪初,法国蜂农报告称吡虫啉的使用导致蜜蜂群体性死亡现象的出现.随后,2003 年由法国农

业部指派的相关专家经过数月现场勘查发现,吡虫啉的使用会导致蜜蜂出现行为异常现象,损害了它们的记忆能力,相互交流的能力,觅食能力,以及返回蜂群的能力等^[4-5].随后,美国养蜂人也于 2006 年冬注意到了类似的奇怪现象,它们所饲养的蜜蜂成批成批死亡,大约有 35% 的蜜蜂陆续消失,而原因却始终不明^[6].

本研究使用同源模建的方法,构建蜜蜂与桃蚜相应的烟碱乙酰胆碱受体,随后与吡虫啉进行分子对接,找到对接结果的异同点,探究吡虫啉对蜜蜂造成伤害的作用成因,为进一步深入研究并设计出对桃蚜具有高毒性同时对蜜蜂安全的新型新烟碱类杀虫剂提供实验数据.

1 实验部分

烟碱乙酰胆碱受体(nicotinic acetylcholine receptor, nAChR)属于配体门控离子通道蛋白,同甘氨酸(Gly)受体、谷氨酸(Glu)受体、 γ -氨基丁酸(GABA_A, GABA_C)受体以及 5-羟色胺(5-HT₃)受体等同属于半胱氨酸环受体超家族^[7-8].当与相应的配体发生特异性结合时会被激活,它也是新烟碱类杀虫剂分子的重要靶标^[9-10].nAChR 是由五个亚基以不同的组合模式构成的

收稿日期:2013-03-15

基金项目:武汉工程大学创新基金(cx201103)

作者简介:巨修练(1959-),男,陕西乾县人,教授,博士,博士研究生导师.研究方向:计算机药物辅助设计、新农药研发、生物活性测试.

五聚体蛋白,其广泛分布于中枢神经系统和周围神经系统中^[11]。研究表明,其在认知、学习、注意能力等活动中发挥着不可替代的作用。而其中每个亚基又各有不同,当它们以不同形式组合在一起时,会形成具有不同配体亲和力、离子选择性、电导率、脱敏性、调控机制以及药理学特性的 nAChR。人们对哺乳动物 nAChR 的研究较为深入,取得的研究成果也较为突出。而对昆虫类 nAChR 的研究虽然不如脊椎动物彻底,但随着近些年来对新烟碱类化合物的不断探索,在分子生物学、药理学、毒理学等不同领域中都不程度地揭示了昆虫 nAChR 的相关性质^[12-13]。昆虫的烟碱乙酰胆碱受体亚基种类较多,因此其结构差异性较大。

蜜蜂是负责给多种农作物传授花粉的主要生物,它的死亡每年仅在美国就会造成数百亿美元的损失,因此亟需探明是什么原因导致了大批量工蜂集体死亡。科学家们把这种离奇的现象称作“蜂群衰竭失调”,并设法分析其原因,他们提出了形形色色的理论,比如可能与以色列急性麻痹病毒(Israeli acute paralysis virus)有关,也有说可能是由于郊区城市化、杀虫剂、农药、害虫、蜜蜂营养不良、蜂群饲养管理不当、真菌感染、免疫力不足、转基因农作物、气候变暖、电磁波辐射等,但广为接受的一种观点认为,“蜂群衰竭失调”现象的发生是多种原因共同作用的结果。但有研究表明,新烟碱类化合物在排除外部因素的干扰下,对蜂群内工蜂的数量有明显的削弱迹象。因此,新烟碱类杀虫剂近年来的大规模使用,是导致“蜂群衰竭失调”现象的重要原因之一。如今,法国、德国和斯洛文尼亚等欧洲国家由于担心对蜜蜂群体的严重影响,已经开始限制新烟碱类化合物的使用。本研究以“静水椎实螺”乙酰胆碱结合蛋白与吡虫啉分子结合的共晶化合物(acetylcholine-binding protein, AChBP)(蛋白质数据库序列号:2ZJU)作为模板,使用同源模建方法得到了蜜蜂($\alpha 1$)₂($\beta 1$)₃和桃蚜($\alpha 2$)₂($\beta 1$)₃ nAChR 的模型,根据它们与吡虫啉分子的对接结果,分析吡虫啉与益虫蜜蜂和害虫桃蚜结合模式的异同点,找出吡虫啉致死蜜蜂的真正原因。

本研究所有同源模建与分子对接工作是在微软视窗-7(Win7)平台上使用 Tripos 公司的分子模拟软件 SYBYL X-1.2 版本完成的。具体参数以标注为准,未说明的参数选择皆为系统默认值。蜜蜂($\alpha 1$)₂($\beta 1$)₃型和桃蚜($\alpha 2$)₂($\beta 1$)₃型 nAChR 三维结构的同源模建部分具体步骤如下:

a. 序列的选取与下载。为了分别构建蜜蜂的 $\alpha 1$ 和 $\beta 1$ 亚基以及桃蚜的 $\alpha 2$ 和 $\beta 1$ 亚基,从 Swiss-Prot/TrEMBL 数据库下载得到了蜜蜂、桃蚜各亚基的原序列,包括:蜜蜂 $\alpha 1$ 亚基(蛋白质一级序列号:AOEIZ1), $\beta 1$ 亚基(蛋白质一级序列号:AOEIZ8),桃蚜 $\alpha 2$ 亚基(蛋白质一级序列号:P91764), $\beta 1$ 亚基(蛋白质一级序列号:Q9NFX8)。并对蜜蜂、桃蚜各亚基进行适当的结构修饰,仅保留了需要构建的 4 段膜外区域。

b. 模板的选取。笔者选取了蜗牛“静水椎实螺”(Lymnaea stagnalis)乙酰胆碱结合蛋白与吡虫啉分子的共晶化合物作为模板,来构建蜜蜂 $\alpha 1$ 、 $\beta 1$ 亚基和桃蚜 $\alpha 2$ 、 $\beta 1$ 亚基。

c. 亚基的构建。将选定的模板结构导入 SYBYL X-1.2 软件中,再进行去除 H₂O、添加 H 以及侧链优化等步骤。将通过手动剪切的目标序列与处理过的模板序列进行比对,系统会自动生成一个多序列比对文件。然后使用 SYBYL 软件的模建模块——Advanced protein modeling 下属的 ORCHESTRAR 模块导入该文件,使得模板序列与三维结构一一对应,自动将两序列进行结构比对后自动构建氨基酸的肽链结构。

d. 模型的组成。再将经过模建后的蜜蜂 $\alpha 1$ 、 $\beta 1$ 亚基和桃蚜 $\alpha 2$ 、 $\beta 1$ 亚基分别叠合到对应的模板亚基上,以 A- α 、B- β 、C- α 、D- β 、E- β 的顺序分别构建蜜蜂($\alpha 1$)₂($\beta 1$)₃型和桃蚜($\alpha 2$)₂($\beta 1$)₃型烟碱乙酰胆碱受体。

e. 模型的分子动力学模拟。随后使用分子动力学手段对构建得到的蜜蜂($\alpha 1$)₂($\beta 1$)₃型和桃蚜($\alpha 2$)₂($\beta 1$)₃型 nAChR 模型进行了结构优化。首先选择 Amber7 ff99 立场对构建的模型进行共轭梯度法优化,AMBER 力场是在生物大分子的模拟计算领域有着广泛应用的分子立场之一,主要适用于生物大分子和高分子模拟计算的力场体系,对小分子体系的计算结果通常不能令人满意。采用分子模拟软件 SYBYL 软件中的 Dynamics 模块对模建受体进行分子动力学模拟。选择在 NPT(等离子等温定压)系综下进行模拟过程。模拟时长设定为 500 ps,而步长为 1 fs,采样时间间隔为 2.5 ps。此外,模拟系统内温度设定为 300 K,模拟压为 0.101 MPa。

2 结果与讨论

2.1 模型的验证结果

实验中,将蜜蜂的 $\alpha 1$ 和 $\beta 1$ 亚基以及桃蚜的 $\alpha 2$ 和 $\beta 1$ 亚基与蜗牛“静水椎实螺”AChBP 与吡虫

咪共晶复合物的模板序列进行比对(见图1)。结果显示,蜜蜂 $\alpha 1$ 和 $\beta 1$ 亚基与模板序列的序列一致性分别为26.09%和29.95%;而与模板序列的序列一致性分别为27.94%和24.16%。环区(Loop)是构成

配体与受体进行分子对接的“结合口袋”的主要所在区域。表1为将蜜蜂的 $\alpha 1$ 和 $\beta 1$ 亚基以及桃蚜的 $\alpha 2$ 和 $\beta 1$ 亚基与模板进行序列比对,由表可以看到,在六个环区内的氨基酸残基是高度保守的。

[D][E][I]	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	
Ls_AChBP	--AANDADILYNIRQTSEPDVI-PTQRDR-PVAVSVSLMFINILEVNEITNEV-DVVFVQQTWSDRTLAWDSSH															
A_alpha1	-ASANSERAKRLYDDLLSNYNRLIPVGNNSDRLTVKMGILHSQILIV-NLKNQIMTTNVHVEQEWNDYKLRNFPDD															
A_beta1	ICSNLGLHILLISAVSRHGYNKLIPVQNMTERVHVNFGGLAFVQLINVNE-KNQIMKSNVHLRFINTDYQLQWDEAD															
M_alpha2	-----KRLYDDLLSNYNRLIPVGNNSDRLTVKMGILHSQILIV-NLKNQIMTTNVHVEQEWNDYKLRNFPDD															
M_beta1	---SEDEERLVRDLFRGYNKLIPVQNMTERVHVNFGGLAFVQLINVNE-KSQIMKSNVHLRLVWRDYQLQWDEAD															
loop D																
[D][E][I]	80	85	90	95	100	105	110	115	120	125	130	135	140	145	150	
Ls_AChBP	--SPDQVSVPISSLVWPDLAAY-NAISNHEVLTPQLAHVVSQGVLYMPSIRQRFSCDVSQGVDTESGATCIRI															
A_alpha1	YGGVDTLHVPSEHIWLPDIVLYNNADGNVEVTIMTRAILHHTGVVWHPPAIYKSFCEIDVEYFPEDEQTCFMMF															
A_beta1	YGGIGVLRLPPEHVV-----KKS-----NVLII-----YPNGDVLWVPPAIYQSSCD-----QQTICIMKF															
M_alpha2	YGGVDTLHVPSEHIWLPDIVLYNNADGNVEVTIMTRAILHHTGVVWHPPAIYKSFCEIDVEYFPEDEQTCFMMF															
M_beta1	YGGIGVLRLPPEHVV-----KKS-----NVLII-----YPNGDVLWVPPAIYQSSCD-----QQTICIMKF															
loop A								loop E								
[D][E][I]	155	160	165	170	175	180	185	190	195	200	205	210	215	220	225	230
Ls_AChBP	GSWTHHS-----REISVQPTTENSDDS-EYFSQY--SHFEILDVTOKKNSTVYSCCPPEAYEDVSVSLNFAKAGH---															
A_alpha1	GSWTYDGYTVDLRHLAQTEDSNQIEVG--DLTDYIISVSWDIIHVPVAVNEAFYICCEEPYRDIVENITLIRPKKDEDE															
A_beta1	GSWTFNGDQVSLALYNNKHFVLDSDYKSRKRTLFILIP-TVL-ISFLCVLVFYLPAEAGEKVTLTNNWFRGKHTITY															
M_alpha2	GSWTYDGYMMDLRHISQAPDSQVIEVG-IDLDQYYLSVEWDINGVPAVRHEHFFYVCCCEPYLDIFFENITLIRKTL---															
M_beta1	GSWTFNGDQVSLALYNDKQFVD-----LSDYKSGTWDIIHVPVAVNEAFYICCEEPYLDIFFENITLIRKTL---															
loop B				loop F				loop C								

图1 蜗牛“静水椎实螺”的模板序列与蜜蜂的 $\alpha 1$ 和 $\beta 1$ 亚基以及桃蚜的 $\alpha 2$ 和 $\beta 1$ 亚基的序列比对图

Fig. 1 Result of sequence alignment for honeybee, peach-potato aphid subunit and model chain

对构建模型的分子动力学模拟结果显示,蜜蜂($\alpha 1$)₂($\beta 1$)₃型nAChR模型在开始的150 ps里,能量降低较为明显,观察到从0 kcal/mol下降到-2 000 kcal/mol。在接下来的350 ps时间,能量值稳定在-2 500~-2 000 kcal/mol内浮动。由此可以判断,所构建的蜜蜂($\alpha 1$)₂($\beta 1$)₃型nAChR模型是比较稳定的。而在桃蚜($\alpha 2$)₂($\beta 1$)₃型nAChR

模型的动力学模拟图中可知,其能量更加稳定。模拟结果进入100 ps后,便基本稳定在-2 500~-2 000 kcal/mol的范围内,随后400 ps内在该区间内小幅波动较为稳定。由此可以判断,桃蚜($\alpha 2$)₂($\beta 1$)₃型nAChR模型比蜜蜂($\alpha 1$)₂($\beta 1$)₃nAChR模型更为稳定。

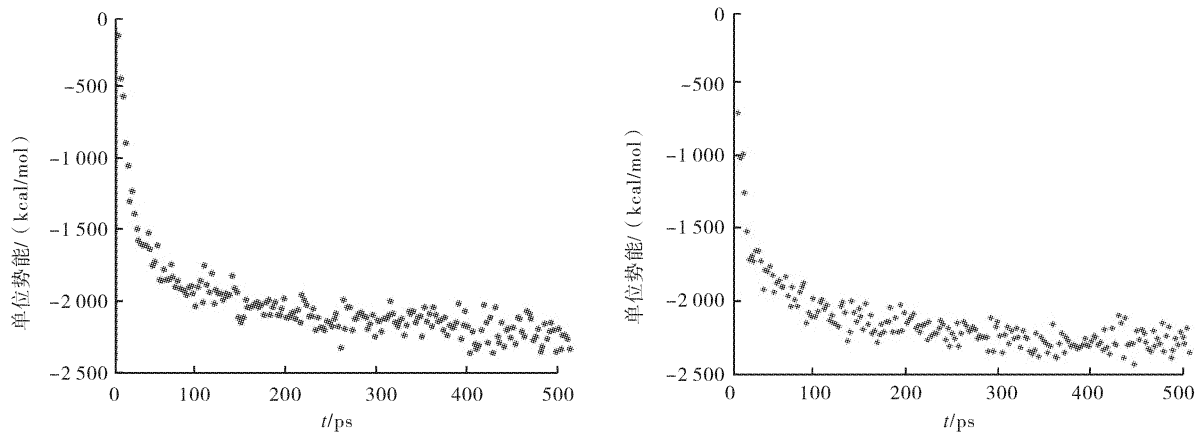


图2 蜜蜂($\alpha 1$)₂($\beta 1$)₃型和桃蚜($\alpha 2$)₂($\beta 1$)₃型nAChR的500 ps分子动力学模拟图

Fig. 2 Plot of the total potential energy of the honeybee(a) and peach-potato aphid(b) model versus simulation time

此外,使用SYBYL软件包下的ProTable模块进行立体化学验证,图2为蜜蜂($\alpha 1$)₂($\beta 1$)₃型和桃蚜($\alpha 2$)₂($\beta 1$)₃型nAChR的拉氏图(Ramachandran Map)。所构建的蜜蜂、桃蚜nAChR模型具有大量的 β 折叠,而拉氏图结果显示,两个模型的拉氏图中有较多的氨基酸残基聚集在-135°到135°处,而该区域正是 β 折叠在拉氏

图上的对应区域。在蜜蜂和桃蚜nAChR模型中,分别有97.81%和98.23%的氨基酸残基位于一般可接受区域(Additionally accepted region)或最大可接受区域(Most accepted region)中。通过动力学模拟结果和拉氏图验证,接下来进行构建模型与分子对接研究。

2.2 分子对接结果

使用 Surflex-docking 模块进行分子对接实验. 将吡虫啉(Imidacloprid)分子分别与同源模建

得到的蜜蜂($\alpha 1$)₂($\beta 1$)₃型和桃蚜($\alpha 2$)₂($\beta 1$)₃型 nAChR 进行分子对接. 最高打分结果下的氢键键长、键角、给体和受体情况如表 1 所示.

表 1 吡虫啉与蜜蜂和桃蚜 nAChR 对接时形成氢键的键长、键角、氢键给体和氢键受体数据表

Table 1 distance and angle of H-bonds from honeybee and peach-potato aphid nAChRs and IMI

受体类型	配体	原子 1	原子 2	键长/nm	键角/($^{\circ}$)
蜜蜂($\alpha 1$) ₂ ($\beta 1$) ₃ 型烟碱乙酰胆碱受体	吡虫啉	A 链色氨酸 152 中吡咯 H	硝基 N	0.285 5	125.11
		A 链色氨酸 152 中吡咯 H	硝基 O	0.191 9	141.10
桃蚜($\alpha 2$) ₂ ($\beta 1$) ₃ 型烟碱乙酰胆碱受体	吡虫啉	A 链半胱氨酸 197 中氨基 H	硝基 O	0.188 2	131.41
		A 链缬氨酸 196 中氨基 H	硝基 O	0.214 2	118.88
		B 链精氨酸 57 中氨基 H	硝基 O	0.239 3	128.09

蜜蜂($\alpha 1$)₂($\beta 1$)₃型和桃蚜($\alpha 2$)₂($\beta 1$)₃型 nAChR 与吡虫啉分子对接的结合自由能最高值分别为-9.592 4 kcal/mol 和-7.124 1 kcal/mol. 而该数据与吡虫啉和蜜蜂、桃蚜结合的 IC_{50} 值结果相吻合(分别为 2.8 nm 和 3.1 nm). 说明吡虫啉分子对所构建的两个模型均具有较高的亲和力. 同时也可知,其对益虫蜜蜂有着与害虫桃蚜同等效应的毒性作用.

图 2 为吡虫啉分子与蜜蜂($\alpha 1$)₂($\beta 1$)₃型烟碱乙酰胆碱受体结合图. 吡虫啉分子深入到了由 α (+)/ β (-)亚基组成的结合口袋中. 对接图显示,在蜜蜂($\alpha 1$)₂($\beta 1$)₃型 nAChR 中,吡虫啉分子主要与来自 $\beta 1$ 亚基的环区 B 片段发生相互作用. Tomizawa 和 Casida 在相关论文中阐述了与昆虫烟碱乙酰胆碱受体发生相互作用的主要是吡虫啉的硝基部分,而在本次研究得到的对接结果中可以看出,蜜蜂模型的 α 亚基环区 B 中的 Tyr152 与吡虫啉分子硝基的 N 原子和 O 原子均发生了氢键作用,其与模板结构中的 Trp143 相对应^[14]. 还可以观察到,吡虫啉的氯吡啶基团渗入到一个由 α 亚基的 Trp152, Tyr96, Tyr201 和 Tyr208 以及 β 亚基的 Trp59 构成的疏水口袋中,形成了相应的阳离子- π 作用. 这一作用在 Bisson 等人所构建的人类 $\alpha 4/\beta 2$ 和 $\alpha 7$ 神经型烟碱乙酰胆碱受体中均有报道,但相类似的疏水口袋在吡虫啉与桃蚜模型对接图中并未出现^[15]. 此外,在与蜜蜂模型对接结果中,吡虫啉的吡啶环与 α 亚基的 Tyr201 发生了明显的 π - π 对接作用,而这一作用也并未在吡虫啉与桃蚜模型的对接结果中发现.

而在吡虫啉与桃蚜模型的对接图中(见图 3),吡虫啉的硝基部分主要与 α 亚基环区 C 以及 β 亚基的环区 D 发生相互作用. 同吡虫啉与蜜蜂模型的对接图比较我们不难发现,与桃蚜模型的对接结果中,吡虫啉的硝基部分发生了完全翻转,朝向了 α 亚基的半胱氨酸环区域,而环区 C(氨基酸序列为 YXCC)中的 Val196 和 Cys197 与吡虫啉分子硝基的两个 O 原子发生了氢键作用. Shimomura 等人曾经报道过发生在果蝇 $\alpha 2\beta 2$ 烟碱乙酰胆碱受体的 $\alpha 2$ 亚基环区 C 上的 Pro 突变为 Glu 会导致吡虫啉对其亲和力降低^[16]. 此外,对应模型中的 Gln55 的分别为蜜蜂 $\beta 1$ 亚基的 Arg61 和桃蚜 $\beta 1$ 亚基的 Arg57, Shimomura 等人也曾经报道过鸡 $\alpha 7$ 同源 nAChR 中的 Gln 突变为 Arg 会导致吡虫啉效应的提升^[17-18]. 而脊椎动物的 nAChR,例如人类 $\beta 4$ 亚基在该位点为赖氨酸,与吡虫啉分子均没有发生明显的相互作用. 由此可以推断,该位点的氨基酸残基 Arg 是导致吡虫啉与两模型对接结果无选择性的主要原因之一. 且吡虫啉硝基上的 O 原子与桃蚜模型 $\beta 1$ 亚基的 Arg57 的侧链直接发生了氢键作用,而类似的氢键作用在蜗牛乙酰胆碱蛋白和吡虫啉对接中也有发现. 验证了环区 D 区域会与吡虫啉分子的硝基或氰基直接形成相互作用.

3 结 语

本实验采用 SYBYL 软件中的同源模建手法,以“静水椎实螺”(Lymnaea stagnalis)乙酰胆碱结合蛋白与吡虫啉分子的共晶化合物为模板,构建

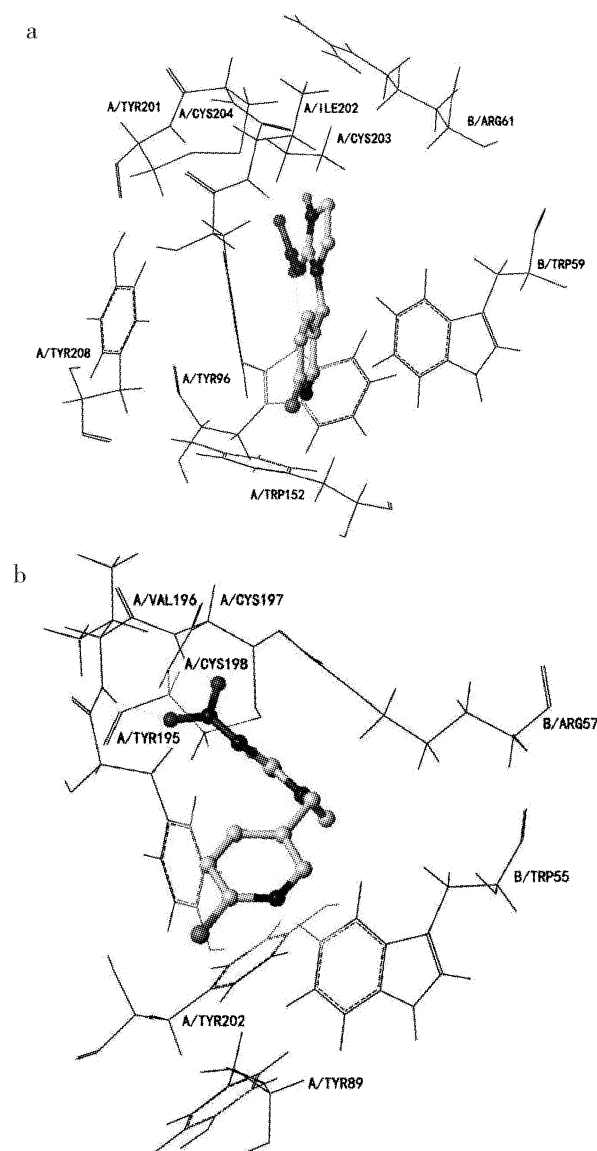


图3 吡虫啉与蜜蜂及桃蚜 nAChR 对接图

Fig. 3 Images of IMI docking with honeybee and peach-potato aphid nAChRs

注: a: 吡虫啉与蜜蜂($(\alpha 1)_2(\beta 1)_3$ nAChR 对接图;

b: 吡虫啉与桃蚜($(\alpha 2)_2(\beta 1)_3$ nAChR 对接图。

了蜜蜂($(\alpha 1)_2(\beta 1)_3$ 型 nAChR 和桃蚜($(\alpha 2)_2(\beta 1)_3$ 型 nAChR. 经过拉氏图和分子动力学模拟过程验证了所建模型的合理性和可靠性. 将新烟碱类化合物的代表吡虫啉分别于所构建模型进行分子对接, 所得到的结合自由能结果实验数据与 IC_{50} 相吻合. 此外, 对接结果显示, 吡虫啉的硝基部分在对接中起到了关键作用, 是吡虫啉对两受体无选择性作用的主要原因, 同时也证明了吡虫啉的使用确实危害到了蜜蜂群体的生存.

致谢

本研究获得武汉工程大学研究生处的资助, 在此特别鸣谢!

参考文献:

- [1] 李阳, 黄翔, 陈达, 等. 5-芳基-3-羟基异恶唑的合成[J]. 武汉工程大学学报, 2011(5): 18-21.
LI Yang, HUANG Xiang, CHEN Da, et al. Synthesis of 5-aryl-substituted-3-hydroxy-isoxazoles [J]. Journal of Wuhan Institute of Technology, 2011(5): 18-21. (in Chinese)
- [2] SUCHAIL S, GUEZ D, BELZUNCES L P. Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera* [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2001, 20 (11): 2482-2486.
- [3] OLDROYD B P. What's killing American honey bees? [J]. PLOS Biol, 2007 (5): 1195-1199.
- [4] FAUCON J P, AURI RES C, DRAJNUDEL P, et al. Experimental study on the toxicity of imidacloprid given in syrup to honey bee (*Apis mellifera*) colonies [J]. Pest Management Science, 2005, 61 (2): 111-125.
- [5] NAUEN R, EBBINGHAUS-KINTSCHER U, SCHMUCK R. Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) [J]. Pest Management Science, 2001, 57(7): 577-586.
- [6] VANENGELSDORP D, EVANS J D, SAEGERMAN C, et al. Colony collapse disorder: a descriptive study [J]. Plos One, 2009, 4(8): 1-17.
- [7] UNWIN N. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4 Å resolution [J]. Journal of Molecular Biology, 2005, 346(4): 967-989.
- [8] UNWIN N, MIYAZAWA A, LI J, et al. Activation of the nicotinic acetylcholine receptor involves a Switch in conformation of the alpha subunits [J]. Journal of Molecular Biology, 2002, 319 (5): 1165-1176.
- [9] TOMIZAWA M, LEE D L, CASIDA J E. Neonicotinoid insecticides: molecular features conferring selectivity for insect versus mammalian nicotinic receptors [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(12): 6016-6024.
- [10] SATTELLE D B. Invertebrate nicotinic acetylcholine receptors-targets for chemicals and drugs important in agriculture, veterinary medicine and human health [J]. Journal of Pesticide Science, 2009, 34 (4): 233-240.
- [11] CORRINGER P J, LE NOVÈRE N, CHANGEUX J P. Nicotinic receptors at the amino acid level [J]. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2000, 40: 431-458.

- [12] TOMIZAWA M, CASIDA J E. Imidacloprid, thiacloprid, and their imine derivatives Up-Regulate the $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor in M10 cells[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2000, 169(1): 114-120.
- [13] TOMIZAWA M, CASIDA J E. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors [J]. Annual Review of Entomology, 2003, 48: 339-364.
- [14] TOMIZAWA M, CASIDA J E. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action [J]. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2005, 45:247-268.
- [15] BISSON W H, WESTERGAARD G, SCHUBIGER P A, et al. Homology modeling and dynamics of the extracellular domain of rat and human neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes $\alpha 4\beta 2$ and $\alpha 7$ [J]. Journal of Molecular Modeling, 2008, 14(10): 891-899.
- [16] SHIMOMURA M, YOKOTA M, MATSUDA K, et al. Roles of loop C and the loop B-C interval of the nicotinic receptor α subunit in its selective interactions with imidacloprid in insects [J]. Neuroscience Letters, 2004, 363(3): 195-198.
- [17] SHIMOMURA M, YOKOTA M, IHARA M, et al. Role in the selectivity of neonicotinoids of insect-specific basic residues in loop D of the nicotinic acetylcholine receptor agonist binding site [J]. Molecular Pharmacology, 2006, 70(4): 1255-1263.
- [18] SHIMOMURA M, SATOH H, YOKOTA M, et al. Insect-vertebrate chimeric nicotinic acetylcholine receptors identify a region, loop B to the N-terminus of the Drosophila $\alpha 2$ subunit, which contributes to neonicotinoid sensitivity [J]. Neuroscience Letters, 2005, 385(2): 168-172.

Homology modeling of honeybee and peach-potato aphid nAChRs and surflex-docking

JU Xiu-lian, LI Ke, WANG Li-li

(Key Laboratory for Green Chemical Process of Ministry of Education, School of Chemical Engineering and Pharmacy, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: To explore how Imidacloprid affect honeybee, three-dimensional models of honeybee (*Apis mellifera*) $\alpha 1/\beta 1$ and peach-potato aphid (*Myzus persicae*) $\alpha 2/\beta 1$ nAChRs were constructed using homology modeling method of SYBYL X-1. 2, crystal structure of the acetylcholine-binding protein of *Lymnaea stagnalis* were used as the template. The quality of the models was confirmed by molecular dynamics. Furthermore, nAChR agonist insecticide Imidacloprid (IMI) was docked into the putative binding site of the honeybee (*Apis mellifera*) $\alpha 1/\beta 1$ and peach-potato aphid (*Myzus persicae*) $\alpha 2/\beta 1$ nAChRs by Surflex-docking, respectively. The binding free energy of docking results are in agreement with the experimental data and the binding sites were consistent with the results from the labeling and mutagenesis experiments. The binding results of IMI binding with honeybee (*Apis mellifera*) and peach-potato aphid (*Myzus persicae*) nAChRs show that the binding free energy of IMI docking with honeybee and peach-potato aphid nAChRs are -9.5924 kcal/mol and -7.1241 kcal/mol, respectively, which demonstrates that IMI has the same-level toxicity to honeybee versus peach-potato aphid. Nitro moiety of IMI interacts with α subunit from honeybee nAChR and bind to residues from β subunit from peach-potato aphid nAChR, which plays a key role in the binding interaction. The experiment data prove that using IMI causes harm to the honeybee colony.

Key words: nACh receptor; honeybee; peach-potato aphid; imidacloprid; homology modeling

本文编辑:张 瑞