农药学学报 2021, 23(5): 856-868
Chinese Journal of Pesticide Science http://www.nyxxb.cn

·研究论文·

doi: 10.16801/j.issn.1008-7303.2021.0098

草地贪夜蛾鱼尼丁受体与双酰胺类杀虫剂的结合模式及抗性风险分析

李 康[#,1,2]，王凯博[#,2]，陶丽红[1]，李 丽[1]，李佳俊[1]，
吴文伟[2]，肖 春[*,1]，叶 敏[*,1]

(1. 云南农业大学 云南生物资源保护与利用国家重点实验室，昆明 650201；
2. 云南省农业科学院 农业环境资源研究所，昆明 650201)

摘 要：为研究草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* (以下简称 FAW) 对双酰胺类杀虫剂的抗性机制，根据 FAW 鱼尼丁受体 (ranodine receptor，RyR) 跨膜区域的氨基酸序列，通过同源建模的方法构建其三维结构；通过对比 FAW 与小菜蛾 *Plutella xylostella* (以下简称 DBM)RyR 跨膜区域的氨基酸序列，发现两者具有较高的同源度，进而根据已报道的 FAWRyR 的突变位点 I4734M 及 DBMRyR 的突变位点 G4946E (对应 FAWRyR 的 G4891)，在 FAWRyR 中引入突变，采用分子对接的方法分别分析其突变前后与 5 种双酰胺类杀虫剂的结合模式。结果表明：FAWRyR 的 I4734M 突变模型与 5 种双酰胺类杀虫剂的亲和力与野生型的无明显差别，均存在氢键、卤键、疏水作用、π-π 相互作用及 π-阳离子作用等非共价相互作用；但 G4891E 突变模型与 5 种双酰胺类杀虫剂的亲和力下降、形成的作用力方式减少，从而影响 RyR 与双酰胺类杀虫剂的结合稳定性。本研究分析发现，FAWRyR 的 G4891E 突变可能导致其对双酰胺类杀虫剂产生抗性，需在今后的研究中关注该突变。该研究结果还可会为基于鱼尼丁受体设计杀虫剂提供参考。

关键词: 草地贪夜蛾；鱼尼丁受体；双酰胺类杀虫剂；同源建模；突变位点；结合模式；抗性风险

中图分类号：TQ450.13；S435.1 **文献标志码：**A **文章编号：**1008-7303(2021)05-0856-13

Analysis of binding modes and resistance risk between ryanodine receptor of *Spodoptera frugiperda* and diamide insecticides

LI Kang[#,1,2], WANG Kaibo[#,2], TAO Lihong[1], LI Li[1], LI Jiajun[1],
WU Wenwei[2], XIAO Chun[*,1], YE Min[*,1]

(1. *State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources in Yunnan*, *Yunnan Agricultural University*, *Kunming* 650201, *China*; 2. *Institute of Agricultural Environment and Resource*, *Yunnan Academy of Agricultural Sciences*, *Kunming* 650201, *China*)

Abstract: To study the resistance mechanism of *Spodoptera frugiperda* (FAW) to diamide insecticides, the three-dimensional structure of the transmembrane region of FAWRyR was constructed by homologous modeling based on its amino acid sequence in this work. It was found those two had high

收稿日期：2021-02-03；**录用日期：**2021-04-28.
基金项目：国家自然科学基金项目 (32060631).
作者简介：[#]李康，男，硕士研究生，**E-mail：**2292034998@qq.com；[#]王凯博，并列第一作者，男，博士，**E-mail：**wangkaibo4015@qq.com；[*]肖春，通信作者 (Author for correspondence)，男，教授，研究方向为昆虫化学生态，**E-mail：**x.chun@163.com；[*]叶敏，通信作者 (Author for correspondence)，男，研究员，研究方向为天然产物农药，**E-mail：**yeminpc@126.com

homology degree compared with the amino acid sequence of FAW and *Plutella xylostella* (DBM) RyR. In addition, the mutation was introduced into the model of FAWRyR according to the reported mutation site of FAWRyR (I4734M) and DBMRyR mutation site G4946E (corresponding to G4891 in FAWRyR), and the binding modes between the wild-type (WT) & mutant FAWRyRs and five kinds of diamides were analyzed by molecular docking. The binding affinity between the substitutions I4734M and diamides showed no significant difference, compared with that between WT FAWRyR and diamides. Both the substitution I4734M and WT FAWRyR existed important non-covalent interactions, such as hydrogen bond, halogen bond, hydrophobic interaction, π-stacking and π-cation interaction. However, the substitution G4891E produced reduction in binding affinity and the number of action mode, which affected the binding stability of FAWRyR and diamides. These results indicated that the substitution G4891E could cause the resistance of FAWRyR to diamides. And future research should focus on the G4891E mutation of FAWRyR. Moreover, this reserch could provide a reference for RyR-structure-based insecticides design.

Keywords: *Spodoptera frugiperda*; ryanodine receptor; diamide insecticides; homologous modeling; mutation sites; binding modes; resistance risk

草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* (以下简称 FAW)，属于鳞翅目、夜蛾科、灰翅夜蛾属，原产于美洲热带和亚热带地区，广泛分布于美洲大陆[1]。2019 年 1 月 11 日首次在中国云南省江城县发现 FAW 幼虫[2]，其主要为害玉米、水稻、高粱和甘蔗等粮食作物的芯叶及果穗，造成农作物产量减少和品质下降[3]。化学农药是防治 FAW 的重要措施。除虫脲 (diflubenzuron)、茚虫威 (indoxacarb) 以及氯虫苯甲酰胺 (chlorantraniliprole)、氟苯虫酰胺 (flubendiamide) 等双酰胺类杀虫剂是中国防治 FAW 的推荐用药，在 FAW 的防治中发挥了重要作用[4]。

目前，杀虫剂抗性行动委员会 (Insecticide Resistance Action Committee, IRAC) 分类的双酰胺类杀虫剂共有 5 个品种：氯虫苯甲酰胺、氟苯虫酰胺、溴氰虫酰胺 (cyantraniliprole)、环溴虫酰胺 (cyclaniliprole) 和四唑虫酰胺 (tetraniliprole)[5]。氯虫苯甲酰胺、氟苯虫酰胺、溴氰虫酰胺等双酰胺类杀虫剂具有杀虫广谱、内吸性好、高选择性及对刺吸式口器害虫防效优异等特点[6-8]，且主要作用鳞翅目和鞘翅目昆虫鱼尼丁受体 (ryanodine receptor，RyR)，其激活 RyR 导致钙离子释放，破坏昆虫体内钙离子平衡，从而影响昆虫的神经肌肉功能[9]。RyR 是一种分布于动物肌细胞内质网和肌浆网上的钙离子通道蛋白，由 4 个相同的亚基构成的同源四聚体，每个亚基含有约 5 000 个氨基酸残基，是目前已发现的最大的离子通道型蛋白[10]。以 RyR 为靶标开发的氟苯虫酰胺和氯虫苯甲酰胺等双酰胺类杀虫剂对小菜蛾 *Plutella xylostella* (以下简称 DBM)、斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 等鳞翅目昆虫均具有较高的毒性，对哺乳动物则低毒、安全。但是，随着双酰胺类杀虫剂的大量使用，其抗药性问题也日益突出[11-14]。

目前，研究鳞翅目害虫对双酰胺类杀虫剂的抗性多以 DBM 为模式害虫。DBM 对双酰胺类杀虫剂已产生了高水平抗性：Guo 等对从广东不同地区采集的 4 个 DBM 种群进行检测发现，其对氯虫苯甲酰胺的抗性水平达 303~658 倍[11]；据 Troczka 报道，泰国 DBM 田间种群对氯虫苯甲酰胺和氟苯虫酰胺的抗性分别高于 200 倍和 750 倍，菲律宾 DBM 田间种群对氯虫苯甲酰胺和氟苯虫酰胺的抗性分别超过 4 100 倍和 1 300 倍[12]。另外，FAW 对双酰胺类杀虫剂也易产生抗性：2018 年在美国波多黎各田间发现，FAW 种群对氟苯虫酰胺产生了 500 倍抗性，对氯虫苯甲酰胺产生了 160 倍抗性[13]；Bolzan 等发现，室内筛选所得抗氯虫苯甲酰胺 FAW 种群与溴氰虫酰胺存在低水平交互抗性 (27 倍)，而对氟苯虫酰胺则存在高达 42 000 倍的交互抗性[15]。目前，DBM 对双酰胺类杀虫剂的抗药性机制较为明确：Troczka 在泰国和菲律宾的 DBM 抗性种群中检测到 RyR 的 G4946E 突变，通过 Sf9 体外表达研究证实了 G4946E突变可影响双酰胺类杀虫剂与 RyR的结合[12]；Steinbach 等进一步强调了 DBMRyR的 G4946E 突变是导致其对双

酰胺类杀虫剂产生抗性的主要机制[16]；郭磊等在云南采集的抗性种群中筛查得到了新的突变位点E1338D、Q4594L和I4790M，并通过荧光配体结合实验验证了含多个突变的DBMRyR与氯虫苯甲酰胺的亲和力显著减弱[11, 17-18]。其他鳞翅目害虫中：甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 的抗性种群对氯虫苯甲酰胺的抗性在150倍以上，通过对其RyR跨膜区域进行测序发现，抗性种群的主要突变为I4743M，但未检测到G4900E等位基因突变[14]；二化螟 *Chilo suppressalis* RyR的G4910E和I4758M的突变也会导致其对双酰胺类杀虫剂产生不同程度的抗性[19-20]。

FAW对双酰胺类杀虫剂的抗性机制相关研究较少。在现有报道中，Boaventura对田间采集的FAW种群进行抗药性诱导，与敏感种群相比，其对氯虫苯甲酰胺和氟苯虫酰胺的抗性分别为225倍和5 400倍。通过对FAWRyR的C-末端结构域Ⅱ~Ⅵ进行测序，发现了一个单核苷酸多态性，导致I4734M突变，因此被认为是对双酰胺类杀虫剂产生抗性的靶点[21]。在有关DBMRyR已报道的突变位点中，G4946E和I4790M频率最高，其中G4946对应FAWRyR中的G4891氨基酸，I4790对应FAWRyR中的I4734氨基酸。FAWRyR中的I4734与DBMRyR的I4790突变报道一致，但尚未见有关FAWRyR中的G4891氨基酸突变引起抗药性的报道。FAWRyR的G4891和I4734氨基酸突变是否是造成其对双酰胺类杀虫剂产生抗性的原因仍需探索。

随着计算机模拟技术的发展，分子对接、同源建模等技术手段日趋成熟。通过计算机预测受体与配体之间的结合模式为研究靶标害虫对杀虫剂的抗性机制提供了新的方法[22]。蛋白质的三维结构由氨基酸序列确定，由于蛋白质的同源性，可以根据已知的蛋白质三维结构预测未知结构的同源蛋白质的初步结构[23]。目前，FAW和DBM的RyR结构尚未被解析，但兔子 *Oryctolagus cuniculus*、野猪 *Sus scrofa* 等哺乳动物的RyR的结构解析已较为成熟，且兔子RyR与氯虫苯甲酰胺结合的结构已被解析 (PDB：7CF9)：氯虫苯甲酰胺主要与兔子RyR蛋白C端跨膜区域中S0-S4构成的活性口袋结合[24]。FAWRyR (序列号：QCQ29110.1)[21]与DBMRyR (序列号：AET09964.1)[25]的氨基酸序列已知，可通过同源建模的方法获得其三维模型及分子对接的方法分析亲和构象。

因此，本研究拟通过同源建模的方法构建DBMRyR和FAWRyR跨膜区域的三维模型，通过在FAWRyR中引入已报道的DBMRyR的突变位点 (G4946E，对应FAWRyR中G4891) 和FAWRyR的突变位点 (I4734M)，构建FAWRyR的突变模型；通过分子对接的方法研究FAWRyR突变前后与双酰胺类杀虫剂的结合模式，分析FAWRyR突变位点与抗药性的关系。本研究从结构生物学角度探究FAW抗双酰胺类杀虫剂的机理，旨在为研究FAW对双酰胺类杀虫剂的抗性奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 计算机软件与在线工具

1.1.1 软件 Open Babel-2.4.1[26]、UCSF Chimera-1.11.2[27]、Pymol-2.1.0[28]、Autodock Tool-1.5.6[29]和Autodock Vina-1.1.2[30]。

1.1.2 在线工具

同源建模在线工具SWISS-MODEL[31]：https://swissmodel.expasy.org/。

蛋白质质量评价工具SAVEs：https://servicesn.mbi.ucla.edu/SAVES/。

蛋白质晶体结构PDB数据库：http://www1.rcsb.org/。

NCBI数据库：https://www.ncbi.nlm.nih.gov/。

跨膜区域预测工具TMHMM[32]：http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/。

作用力分析工具PLIP[33]：https://projects.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip。

保守性分析在线工具MEME[34]：(https://meme-suite.org/meme/)。

1.2 试验方法

1.2.1 同源建模及模型评价 从NCBI数据库中下载DBMRyR氨基酸序列 (序列号：AET09964.1) 和FAWRyR氨基酸序列 (序列号：QCQ29110.1)，通过TMHMM分别预测DBMRyR和FAWRyR的跨膜区域。通过同源建模方法构建FAWRyR (未突变，WT) 蛋白三维模型：选择FAWRyR跨膜区域(S1-S6)的氨基酸序列，以Ma等报道的与FAWRyR氨基酸序列同源度为61.8%的兔子RyR冷冻电镜结构 (PDB：7CF9)[24]的跨膜区域为模板，用SWISS-MODEL工具构建FAWRyR跨膜区域 (S1-S6) 的模型；选择FAWRyR跨膜区域 (S0) 的氨基

酸序列，通过 SWISS-MODEL 进行序列对比分析，以 PDB：1p7b.1.A 为模板构建 FAWRyR 跨膜区域 S0 的模型。使用 Pymol-2.1.0 和 UCSF Chimera-1.11.2 软件对在线够建的模型进行拼合、优化，构建出 WT FAWRyR 的四聚体结构。DBMRyR 跨膜区域模型的构建方法亦如此。

使用 SAVEs 的 Procheck[35] 工具，验证所建模型在立体化学上的合理性及能量上的稳定性。各残基间的 Pis 和 Phi 两个角度的合理性评价结果以拉氏图 (Ramachandran Plot) 展示。根据拉氏图中最优区域、额外允许区域、一般允许区域等的百分比评价所建蛋白质模型是否合理[35]。

1.2.2　FAWRyR 突变体构建　将已报道的 DBMRyR 的突变位点 G4946E、I4790M，以及甜菜夜蛾 *S. exigua* RyR 的 G4900E、I4743M[14]，二化螟 *C. suppressalis*RyR 的 G4910E、I4758M[19-20] 与 FAWRyR 氨基酸序列进行对比，结果表明其分别对应 FAWRyR的 G4891E 和 I4734M，其中 I4734M 为已报道的 FAWRyR 突变位点[21]。故本研究使用 UCSF Chimera-1.11.2 软件分别将 FAWRyR 中 G4891 的“Gly”突变为“Glu”、I4734 的“Ile”突变为“Met”，构建突变模型 FAWRyR-E4891 和 FAWRyR-M4734。将 WT FAWRyR、FAWRyR-E4891 及 FAWRyR-M4734 的模型分别用 Autodock Tool-1.5.6 进行能量最小化和去水加氢等处理，作为分子对接受体。

1.2.3　配体构建　从 IRAC 查询双酰胺类杀虫剂：氯虫苯甲酰胺、氟苯虫酰胺、溴氰虫酰胺、环溴虫酰胺和四唑虫酰胺的化学结构，使用 Open Babel-2.4.1 软件获得化学结构的 3D 结构，利用 Autodock Tool-1.5.6 进行能量最小化等处理，作为分子对接配体。

1.2.4　分子对接及结合模式分析

1.2.4.1　分子对接　根据已报道的兔子 RyR 与氯虫苯甲酰胺复合晶体结构的结合位点，通过蛋白质模型叠合预测所建模型的活性口袋位置，并构建 Docking-Box (图 1)。FAWRyRs 对接所用 Box 参数为：center−x = 252.259，center−y = 207.152，center−z = 299.459；size−x = 22.0，size−y = 18.0，size−z = 18.0。

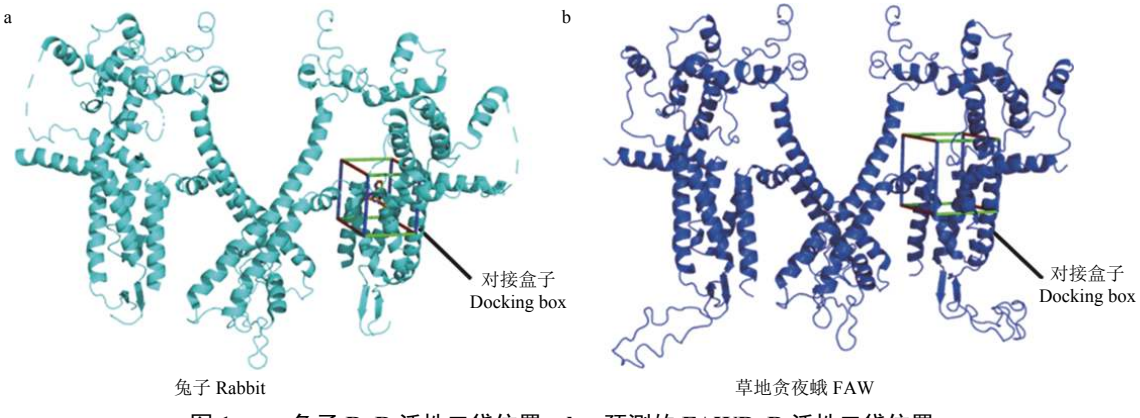


图 1　a：兔子 RyR 活性口袋位置；b：预测的 FAWRyR 活性口袋位置

Fig. 1　a: The active pocket of rabbit RyR; b: The predicted active pocket of FAWRyR

将 1.2.1 节和 1.2.2 节中处理好的蛋白质受体与 1.2.3 节中准备好的配体使用 Autodock Vina-1.1.2 软件进行对接，计算平台 HP-PC：Inter Corei5-1035G1CPU@3.6 GHz；对接参数为：exhaustive ness = 8，numb−modes = 9，energy−range = 3，对接结果按结合亲和力打分排序。

1.2.4.2　结合模式分析　分别选择 5 种配体的最优构象，构建其与受体的复合物，利用 PLIP 在线工具分析配体与受体之间的氢键、卤键、疏水作用、π-π 相互作用及 π-阳离子作用等非共价相互作用力，使用 Pymol-2.1.0 绘制结合模式图。

1.2.5　基因序列保守性分析　将 FAWRyR 跨膜区域的蛋白质序列作为查询序列，在 NCBI 中使用 BLASTP 查询相关同源蛋白。最终得到 100 条与 FAWRyR 同源的蛋白氨基酸序列，且主要以鳞翅目昆虫为主 (表 1)。将这 100 条 RyR 氨基酸序列用 MEME (https://meme-suite.org/meme/) 工具计算分析，获得 Motif 图，并进行保守性分析。

2　结果与分析

2.1　同源建模结果及评价

根据 DBMRyR 和 FAWRyR 的氨基酸序列，

表 1 与 FAWRyR 跨膜区域氨基酸序列具有同源的昆虫基因数量

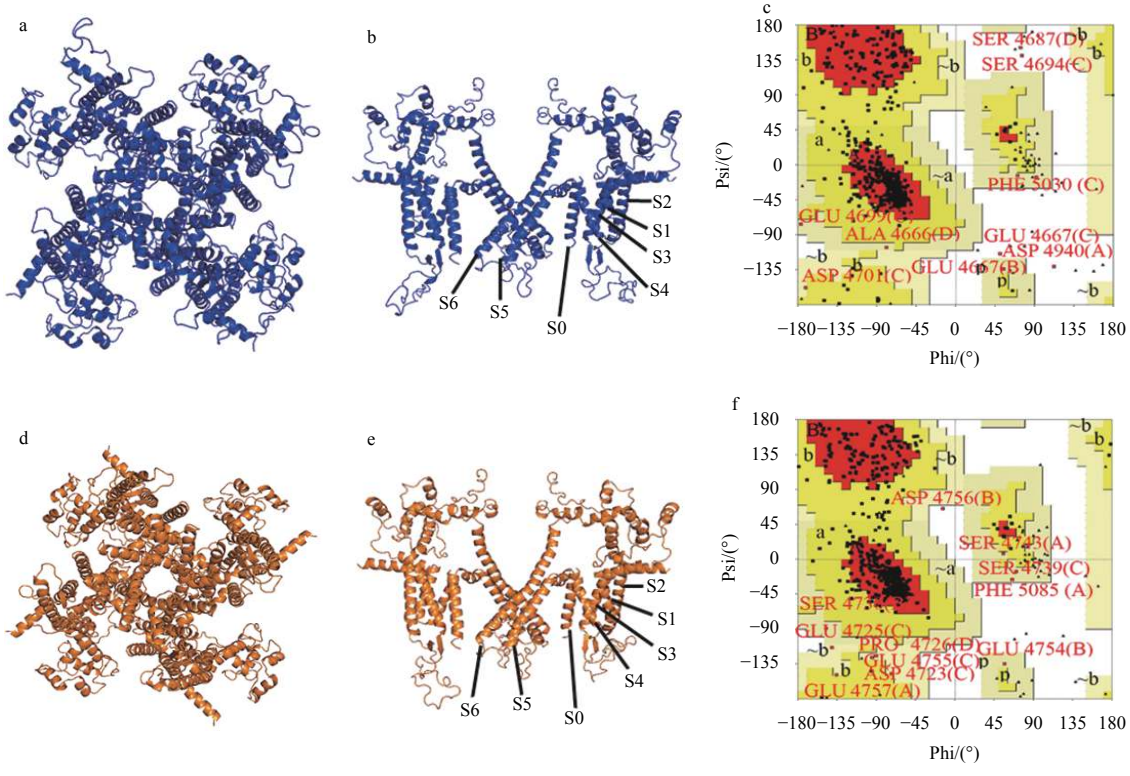
Table 1 The number of insect genes with homologous amino acid sequences with FAWRyR of transmembrane region

目 Order	属 Genus/种 Species	数量 Numbers
鳞翅目 Lepidoptera	草地贪叶蛾 *Spodoptera frugiperda*	3
	斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*	1
	甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*	13
	棉铃虫 *Helicoverpa armigera*	3
	粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni*	1
	东方黏虫 *Mythimna separata*	2
	大蜡螟 *Galleria mellonella*	24
	大螟 *Sesamia inferens*	1
	Maniola hyperanthus	26
	野桑蚕 *Bombyx mandarina*	4
	木虎蛾 *Arctia plantaginis*	1
	家蚕 *Bombyx mori*	14
	夏威夷红蝴蝶 *Vanessa tameamea*	7

分别以 PDB：7CF9 的跨膜区域为模板，构建的跨膜区域 S1-S6；以同源较高的 PDB：1p7b.1.A 为模板，在线构建的跨膜区域 S0，拼合后所得最终 RyR 四聚体结构如图 2a、2d 所示。由图 2a、2d 可知：FAW 和 DBM 的 RyR 的四个亚基呈轴对称分布，每个亚基的氨基酸序列相同，中间有一由亲水性氨基酸残基围成的孔，钙离子从中通过[36]；由图 2b、2e 可知，跨膜区域主要由几组平行的 α 螺旋构成，展示出明显的跨膜蛋白特性。

WT FAWRyR 和 DBMRyR 的模型评价结果如图 2c、2f 所示：WT FAWRyR 及 DBMRyR 的 Procheck 评估结果分别为：最优区域残基占比 87.4%、89.8%，额外允许区残基占比 11.7%、9.5%，两者残基位于允许区域的比例均大于 90%，模型合理。

将 WT FAWRyR 与 DBMRyR 的模型进行叠合对比 (图 3a、3b)，并把 DBMRyR 跨膜区域的氨基酸序列与 WT FAWRyR 跨膜区域的蛋白模型进行对比 (图 3c)，三维结构对比结果显示：两者的 RMSD 值为 0.082，其三维模型差异较小。二维序列对比结果表明：两者的同源度为 92.55%，覆盖度为 99%，具有较高的同源性。

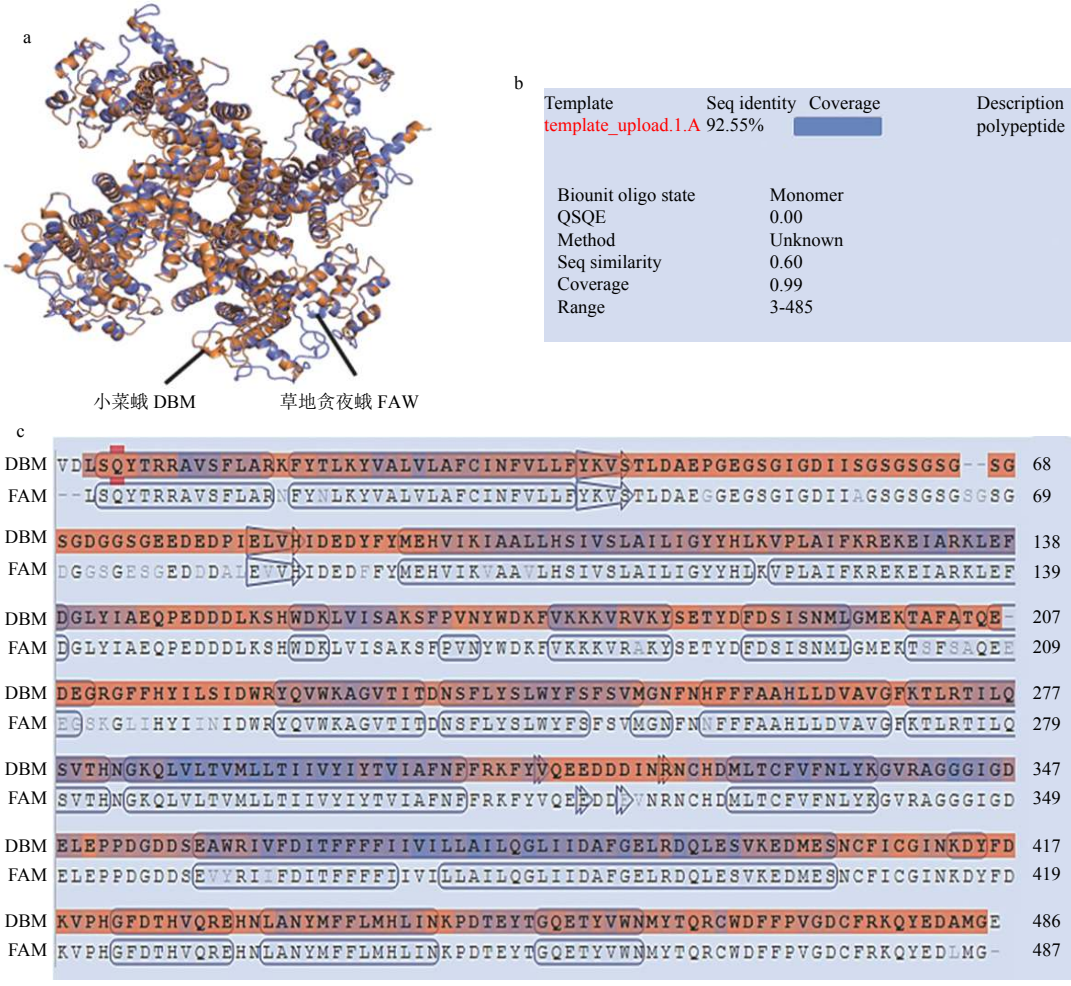


a 和 d：WT FAWRyR 和 DBMRyR 跨膜区域三维模型；b 和 e：WT FAWRyR 和 DBMRyR 跨膜区域 (S0~S6) 的结构 (仅显示二聚体)；c 和 f：WT FAWRyR 和 DBMRyR 跨膜区域模型 Procheck 评价结果。

a and d: Three-dimensional models of the transmembrane region of WT FAWRyR and DBMRyR. b and e: The structure of transmembrane regional (S0-S6) of WT FAWRyR and DBMRyR. c and f: The results of Procheck evaluation of WT FAWRyR and DBMRyR.

图 2 WT FAWRyR 和 DBMRyR 的模型及评价结果

Fig. 2 The models and evaluation results of WT FAWRyR and DBMRyR



a：DBMRyR 与 WT FAWRyR 模型比较 (DBMRyR：金色，WT FAWRyR：蓝色)；b 和 c：DBMRyR 序列与 WT FAWRyR 序列对比。

a: Models comparison between DBMRyR and WT FAWRyR (DBMRyR: golden, WT FAWRyR: blue). b and c: Sequence comparison between DBMRyR and WT FAWRyR.

图 3　模型比较及序列对比

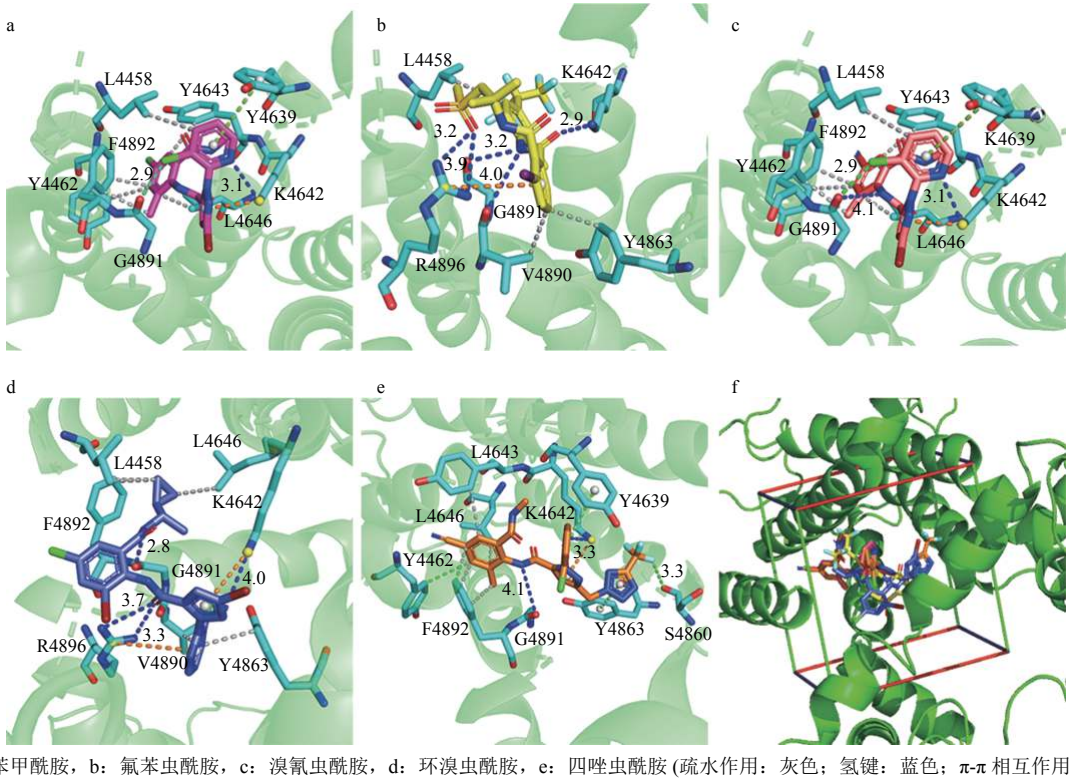
Fig. 3　Models and sequences comparison

2.2　分子对接结果分析

2.2.1　双酰胺类杀虫剂与 WT FAWRyR 的结合模式分析　对接方法验证：将 WT FAWRyR 与 5 种双酰胺类杀虫剂分别对接后 (保留 9 个构象)，根据对接亲和力打分进行排序，并选择最佳对接构象与已解析的兔子 RyR 与氯虫苯甲酰胺的复合晶体进行叠合对比。结果表明：预测的配体构象与实际构象相似，结合模式合理，证明对接方法可行。

WT FAWRyR 与氯虫苯甲酰胺、氟苯虫酰胺、溴氰虫酰胺、环溴虫酰胺及四唑虫酰胺最优构象的结合亲和力分别为：−31.8136、−35.581、−33.488、−30.1392 和−38.0926 kJ/mol。对结合模式进行分析可知：L4458、Y4462、Y4643、L4646 和 F4892 与氯虫苯甲酰胺的苯环及吡啶环形成疏水作用；K4642 与吡啶环上的 N 原子形成氢键；Y4639 与吡啶环形成 π-π 相互作用；K4642 的 N 原子与吡唑环形成 π-阳离子作用；G4891 与吡啶环上的 Cl 原子形成卤键 (图 4a)。L4458、T4863、V4890 与氟苯虫酰胺的苯环形成疏水作用；K4642 与羰基上的 O 原子形成氢键，R4896 与磺酰基上的 O 原子形成氢键，V4890、G4891 与酰胺上的 NH 形成氢键；R4896 的 N 原子与苯环形成 π-阳离子作用 (图 4b)。L4458、Y4462、Y4643、L4646 和 F4892 与溴氰虫酰胺的苯环、吡啶环形成疏水作用；K4642、G4891 分别与吡啶环上的 N 原子和吡唑环侧酰胺结构 NH 形成氢键；Y4639 与吡啶环形成 π-π 相互作用；K4642 与吡唑环形成 π-阳离子作用；G4891 与吡啶环上的 Cl 原子形成卤键 (图 4c)。L4458、L4646、Y4863、V4890 和 F4892 与环溴虫酰胺的吡啶环及环丙基形成疏水作用；K4642 与吡唑环的 N 原子形成氢键，G4891 与环丙基侧酰胺结构的 NH 形成氢

键，R4896 与吡唑环侧羰基的 O 原子形成氢键；K4642、R4896 的 N 原子分别与吡啶环和吡唑环形成 π-阳离子作用 (图 4d)。Y4462、Y4643、L4646 和 F4892 与四唑虫酰胺的苯环形成疏水作用；K4642、G4891 分别与吡啶环上的 N 原子和吡唑环侧酰胺结构的 NH 形成氢键；Y4639 和 Y4863 分别与吡啶环和四唑环形成 π-π 相互作用；K4642 的 N 原子与吡唑环形成 π-阳离子作用；S4860 与三氟甲基上的 F 原子形成卤键 (图 4e)。由于存在疏水作用、π-π 相互作用、π-阳离子作用及分子间形成的氢键和卤键，使分子能稳定存在。5 种杀虫剂与 WT FAWRyR 对接后的位置如图 4f 所示，可见其位置都位于预测的活性口袋内。



a：氯虫苯甲酰胺，b：氟苯虫酰胺，c：溴氰虫酰胺，d：环溴虫酰胺，e：四唑虫酰胺 (疏水作用：灰色；氢键：蓝色；π-π 相互作用：橙色；π-阳离子作用：浅绿色；卤键：绿色); f：5 种杀虫剂结合于 WT FAWRyR 的同一位置。

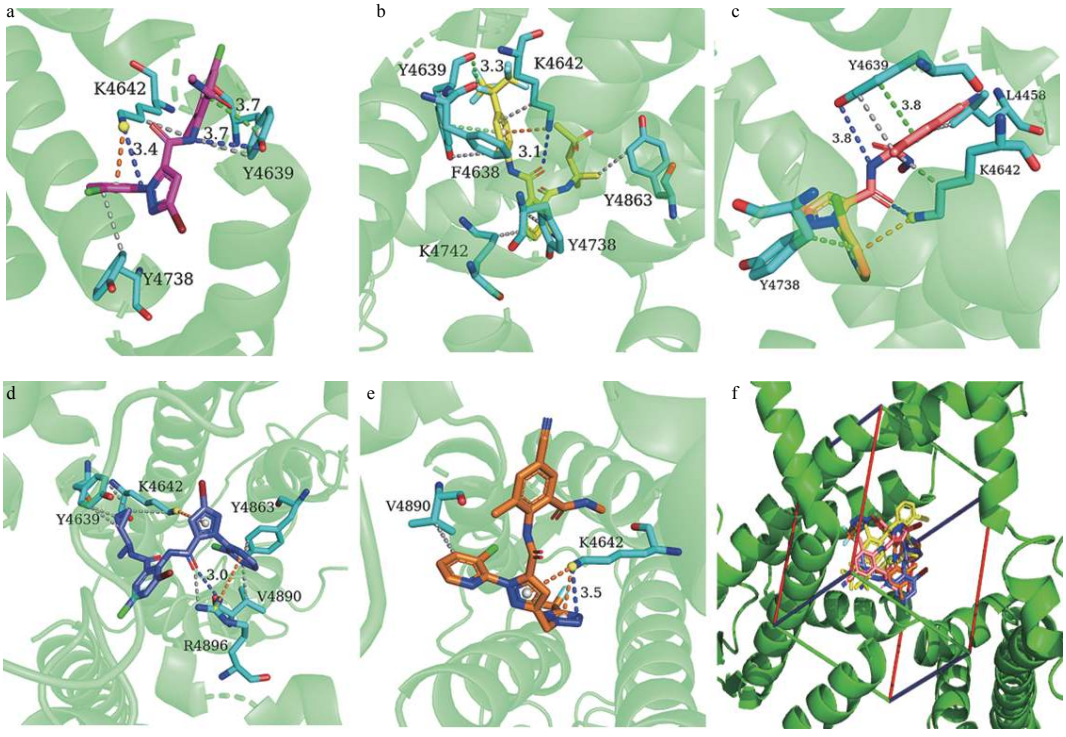
a: chlorantraniliprole; b: flubendiamide; c: cyantraniliprole; d: cyclaniliprole; e: tetraniliprole (hydrophobic interaction: gray; hydrogen bond: blue; π-stacking: orange; π-cation interaction: light green and halogen key: green). f: The five diamides bind to the same active pocket of WT FAWRyR .

图 4 WT FAWRyR 分别与 5 种杀虫剂的结合模式

Fig. 4 Binding modes of WT FAWRyR and the five diamides

2.2.2 双酰胺类杀虫剂与 FAWRyR-E4891 的结合模式分析 FAWRyR-E4891 与氯虫苯甲酰胺、氟苯虫酰胺、溴氰虫酰胺、环溴虫酰胺及四唑虫酰胺最优构象的结合亲和力分别为：−26.371 8、−29.720 6、−28.464 8、−27.209 和−32.650 8 kJ/mol。对结合模式进行分析可知：Y4639、K4642 和 Y4738 与氯虫苯甲酰胺的苯环上的甲基和吡啶环形成疏水作用；Y4639 和 K4642 分别与苯环侧酰胺结构的 NH 和吡啶环上的 N 原子形成氢键；Y4639 与苯环形成 π-π 相互作用；K4642 的 N 原子与吡啶环形成 π-阳离子作用 (图 5a)。F4638、Y4639、Y4738、K4642、K4742 和 Y4863 与氟苯虫酰胺的苯环及甲基形成疏水作用；K4642 与苯环侧羰基上的 O 原子形成氢键；K4642 的 N 原子与苯环形成 π-阳离子作用；Y4639 与苯环形成 π-π 相互作用；Y4639 与三氟甲基上的 F 原子形成卤键 (图 5b)。L4458、Y4639、K4642 和 Y4738 与溴氰虫酰胺的苯环、苯环上的甲基和吡啶环形成疏水作用；Y4639、K4642 分别与酰胺结构 NH 和吡唑环侧上羰基的 O 原子形成氢键；Y4639 与苯环形成 π-π 相互作用，K4642 的 N 原子与吡啶环形成 π-阳离子作用 (图 5c)。Y4639、K4642、Y4863、V4890 和 R4896 与环溴虫酰胺的吡啶环及环丙烷等形成疏水作用；R4896 与吡唑环侧羰基的 O 原子形成氢键；K4642 和 R4896 的 N 原子分别与吡唑环和吡啶环形成 π-阳离子作用 (图 5d)。V4890

与四唑虫酰胺的吡啶环形成疏水作用；K4642 与四唑环上的 N 原子形成氢键；K4642 的 N 原子与四唑环、吡唑环形成 π-阳离子作用 (图 5e)。FAWRyR-E4891 与 5 种杀虫剂对接的位置如图 5f 所示，可见其 5 种构象的位置都位于预测的活性口袋内。



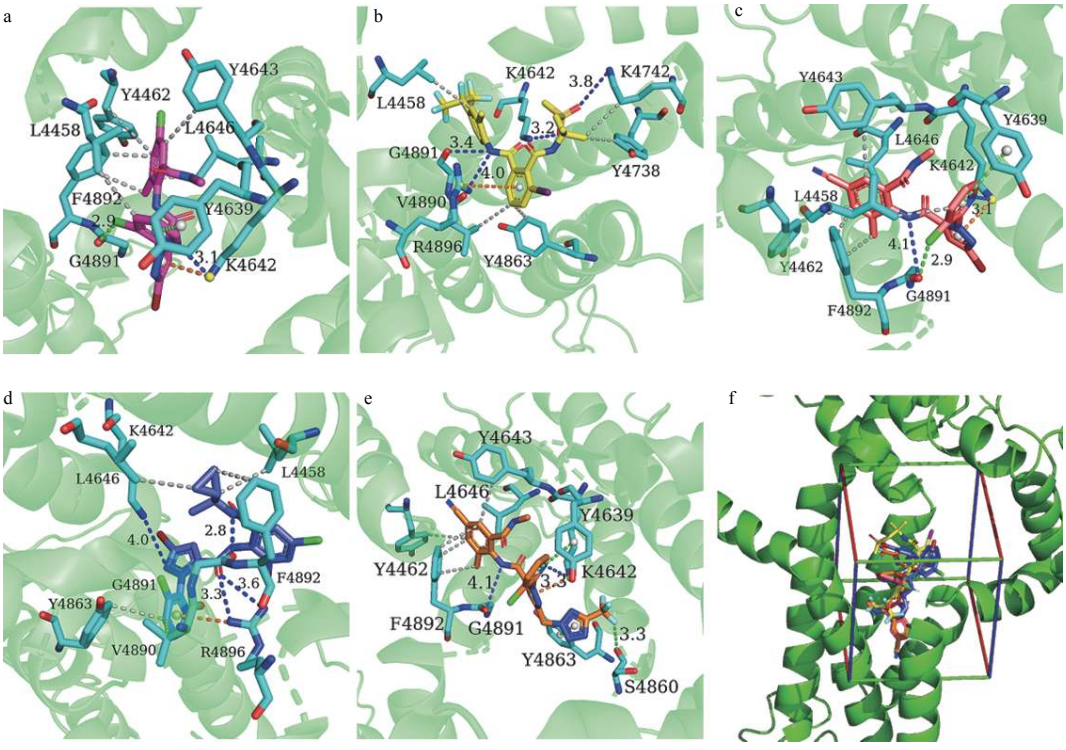
a：氯虫苯甲酰胺，b：氟苯虫酰胺，c：溴氰虫酰胺，d：环溴虫酰胺，e：四唑虫酰胺 (疏水作用：灰色；氢键：蓝色；π-π 相互作用：橙色；π-阳离子作用：浅绿色；卤键：绿色)；f：5 种杀虫剂结合于 FAWRyR-E4891 的同一位置。

a: chlorantraniliprole; b: flubendiamide; c: cyantraniliprole; d: cyclaniliprole; e: tetraniliprole (hydrophobic interaction: gray; hydrogen bond: blue; π-stacking: orange; π-cation interactions: light green and halogen key: green). f: The five diamides bind to the same active pocket of FAWRyR-E4891.

图 5　FAWRyR-E4891 分别与 5 种杀虫剂的结合模式

Fig. 5　Binding modes of FAWRyR-E4891 and the five diamides

2.2.3　双酰胺类杀虫剂与 FAWRyR-M4734 的结合模式分析　FAWRyR-M4734 与氯虫苯甲酰胺、氟苯虫酰胺、溴氰虫酰胺、环溴虫酰胺及四唑虫酰胺最优构象的结合亲和力分别为：−32.232 2、−35.581、−33.906 6、−29.720 6 和−38.512 2 kJ/mol。对结合模式进行分析可知：L4458、Y4462、Y4643、L4646 和 F4892 与氯虫苯甲酰胺的苯环和吡啶环形成疏水作用；K4642 与吡啶环上的 N 原子形成氢键；Y4639 与吡啶环形成 π-π 相互作用；K4642 的 N 原子与吡唑环形成 π-阳离子作用；G4891 与吡啶环上的 Cl 原子形成卤键 (图 6a)；L4458、Y4738、K4742、Y4863 和 V4890 与氟苯虫酰胺的苯环及甲基形成疏水作用；K4642 和 K4742 分别与磺酰基上的 O 原子形成氢键，V4890 和 G4891 与苯环侧酰胺结构的 NH 形成氢键；R4896 的 N 原子与苯环形成 π-阳离子作用 (图 6b)；L4458、Y4462、Y4643、L4646 和 F4892 与溴氰虫酰胺的苯环和吡啶环形成疏水作用；K4642、G4891 分别与吡啶环的 N 原子和酰胺结构的 NH 形成氢键；Y4639 与吡啶环形成 π-π 相互作用，K4642 与吡唑环形成 π-阳离子作用；G4891 与吡啶环上的 Cl 原子形成卤键 (图 6c)；L4458、L4646、Y4863、V4890 和 F4892 与环溴虫酰胺的吡啶环及环丙烷形成疏水作用；K4642 与吡唑环上的 N 原子形成氢键，G4891 与环丙基侧酰胺的 NH 形成氢键，R4896 与丙三环侧羰基的 O 原子形成氢键；R4896 的 N 原子与吡啶环形成 π-阳离子作用 (图 6d)；Y4462、Y4643、L4646 和 F4892 与四唑虫酰胺的苯环形成疏水作用；K4642 与吡啶环上的 N 原子形成氢键，G4891 与苯环侧酰胺结构的 NH 形成氢键；Y4639 和 Y4863 分别与吡啶环和四唑环形成 π-π 相互作用；K4642 的 N 原子与吡唑环形成 π-阳离子作用；S4860 与三氟甲基上的 F 原子形成卤键 (图 6e)；FAWRyR-M4734 与 5 种杀虫剂对接



a：氯虫苯甲酰胺，b：氟苯虫酰胺，c：溴氰虫酰胺，d：环溴虫酰胺，e：四唑虫酰胺 (疏水作用：灰色；氢键：蓝色；π-π 相互作用：橙色；π-阳离子作用：浅绿色；卤键：绿色)；f：5 种杀虫剂结合于 FAWRyR-M4734 的同一位置。

a: chlorantraniliprole; b: flubendiamide; c: cyantraniliprole; d:cyclaniliprole; e: tetraniliprole (hydrophobic interaction: gray; hydrogen bond: blue; π-stacking: orange; π-cation interactions: light green and halogen key: green). f: The five diamides bind to the same active pocket of FAWRyR-M4734 .

图 6 FAWRyR-M4734 分别与 5 种杀虫剂的结合模式

Fig. 6 Binding modes of FAWRyR-M4734 and the five diamides

的位置如图 6f 所示，可见其 5 种构象的位置都位于预测的活性口袋内。

2.3 FAW 突变位点分析

由表 2 可知：FAWRyR 的 4734 位异亮氨酸 (Ile) 突变为蛋氨酸 (Met) 后，与双酰胺类杀虫剂的结合亲和力未下降；FAWRyR 的 4891 位甘氨酸 (Gly) 突变为谷氨酸 (Glu) 后，与双酰胺类杀虫剂的结合亲和力明显降低。

表 2 FAWRyR 突变前后与双酰胺类杀虫剂的结合亲和力变化

Table 2 The binding affinity changes of the wild-type (WT) & mutant FAWRyRs and diamides

双酰胺类杀虫剂 Diamide insecticide	结合亲和力 Binding affinity/(kJ/mol)		
	WT FAWRyR	FAWRyR-E4891	FAWRyR-M4734
氯虫苯甲酰胺 chlorantraniliprole	−31.8136	−26.3718	−32.2322
氟苯虫酰胺 flubendiamide	−35.581	−29.7206	−35.851
溴氰虫酰胺 cyantraniliprole	−33.488	−28.4648	−33.9066
环溴虫酰胺 cyclaniliprole	−30.1392	−27.209	−29.7206
四唑虫酰胺 tetraniliprole	−38.0926	−32.6508	−38.5122

五种双酰胺类杀虫剂与 WT FAWRyR、FAWRyR-E4891 和 FAWRyR-M4734 的结合模式如图 7 所示：将 FAWRyR 的 I4734 突变为 M4734 后，与双酰胺类杀虫剂之间的作用力方式、参与形成作用力的残基和 WT FAWRyR 基本一致，初步分析其主要原因是 FAWRyR 的 4734 号异亮氨酸 (Ile) 不参与配体与受体之间作用力的形成。而 FAWRyR 的 4891 号甘氨酸 (Gly) 与双酰胺类杀虫剂之间存在氢键、卤键相互作用，突变为谷氨酸 (Glu) 后，不能与双酰胺类杀虫剂形成氢键、卤键，导致受体与配体之间的作用力方式减少、亲和力下降。FAWRyR 中 G4891 突变为 E4891 可能是导致 FAW 对双酰胺类杀虫剂产生抗药性的主要原因，而 I4734M 突变可能与抗药性的产生无关。

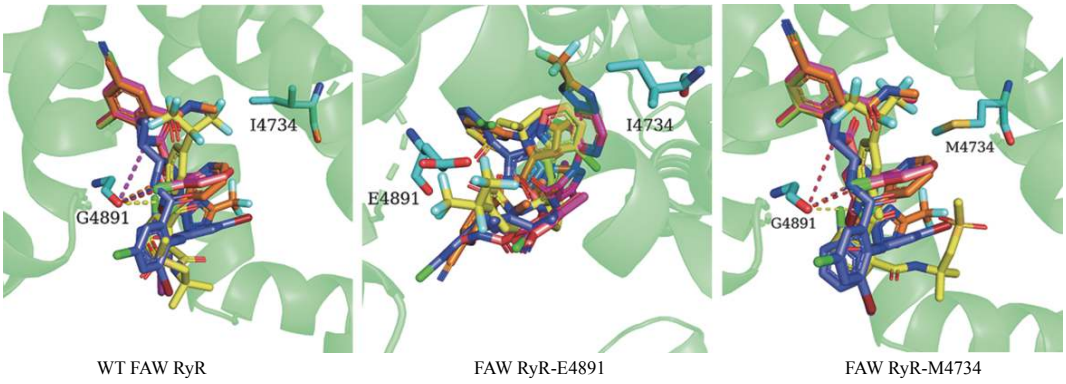


图 7　WT FAWRyR、FAWRyR-E4891 及 FAWRyR-M4734 与 5 种双酰胺类杀虫剂的结合模式对比

Fig. 7　Comparison of binding modes between WT FAWRyR, FAWRyR-E4891, FAWRyR-M4734 and diamides

2.4　氨基酸保守性分析

由 MEME 工具分析得到 Motif 图 (图 8、图 9)，图中 FAWRyR 跨膜区域的活性口袋由 L4458、Y4461、L4641、Y4462、Y4639、K4642、Y4643、S4860、F4861、S4864、V4888、V4890、G4891、F4892 和 K4893 构成 (如图 8 所示)，其中 Y4461、L4641、Y4462、Y4639、K4642、Y4643、S4860、F4861、S4864、V4888、V4890、G4891、F4892、K4893 均在保守区域，而 L4458 在不保守区域，存在 L4458Y 突变的可能 (如图 9 所示)，但尚未见 L4458 氨基酸突变为 Y4458 氨基酸的相关报道，且 L4458 氨基酸不与双酰胺类杀虫剂形成氢键等关键相互作用，L4458Y 突变引起双酰胺类抗药性的几率较低。而 G4891 氨基酸虽在 FAWRyR 的保守区域，但前文研究表明，G4891E 突变会引起 FAWRyR 与双酰胺类杀虫剂的结合亲和力下降，因此，引起抗药性的 G4891E 突变可能为随机突变。

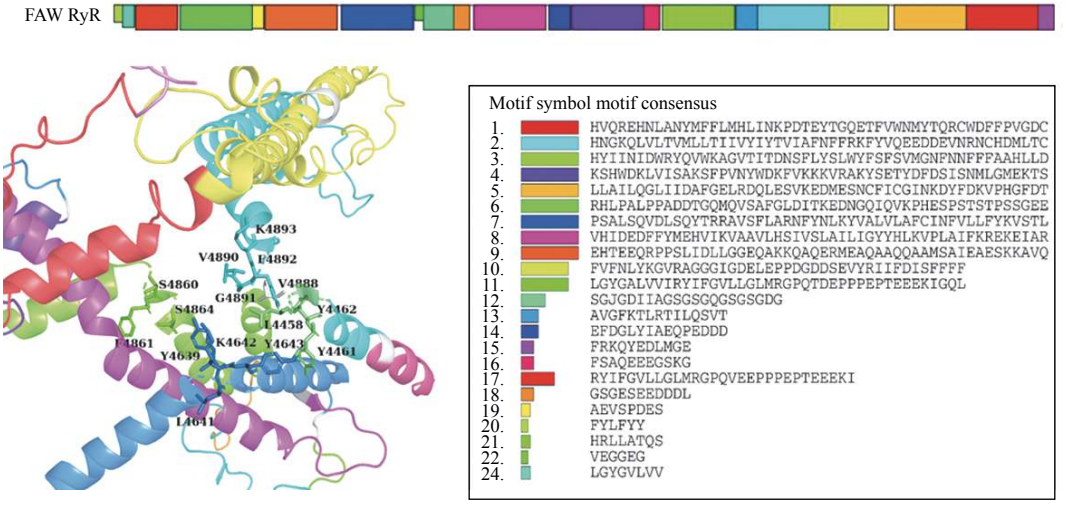


图 8　FAWRyR 跨膜区域氨基酸残基的保守性分析

Fig. 8　Conservative analysis of the residues in transmembrane region of FAWRyR

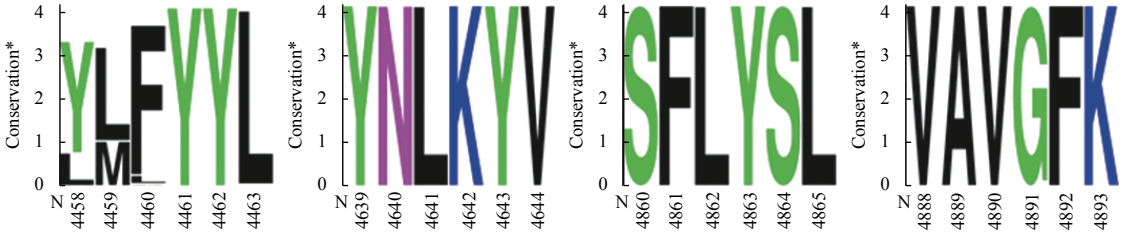


图 9　FAWRyR 组成活性口袋氨基酸残基的保守性分析 (*字母越大，保守性越高)

Fig. 9　Conservative analysis of the residues in active pocket of FAWRyR (* The larger the letter, the more conservation)

3 讨论

解析鳞翅目害虫 RyR 与双酰胺类杀虫剂的结合模式一直是国内外研究的热点。Steinbach 等根据 Yan 等[37] 解析的兔子 RyR (PDB：3J8H) 的结构构建了 DBMRyR 的同源模型，在此模型上引入 G4946E 和 I4790M 突变，并分析了双酰胺类杀虫剂与 DBMRyR 的结合模式，提出 RyR 与双酰胺类杀虫剂的结合位点可能在这两个突变位点附近，但双酰胺类杀虫剂与 DBMRyR 的结合模式、相互作用力以及形成作用力的残基等尚不明确[16]。2020 年，Ma 等使用冷冻电镜解析了兔子 RyR 和氯虫苯甲酰胺复合体的结构 (PDB：7CF9)，揭示了兔子 RyR 中氯虫苯甲酰胺的结合口袋、作用方式以及参与结合的残基[24]，但 FAWRyR 与双酰胺类杀虫剂的结合模式尚不明确。另外，FAW 对双酰胺类杀虫剂的抗性机制的相关研究较少。因此，本研究在已有研究的基础上，选择 PDB：7CF9 为模板，同源构建 FAWRyR 的三维模型，并使用分子对接方法分析 FAWRyR 与双酰胺类杀虫剂的结合模式。结果表明：5 种双酰胺类杀虫剂与 FAWRyR 结合的活性口袋以及两者之间形成作用力的氨基酸残基基本一致。该结果与 Qi 等报道的“氯虫苯甲酰胺和氟苯虫酰胺虽结构上略有差异，但结合位点相同”[38-39] 的观点一致。

目前，鳞翅目害虫对双酰胺类杀虫剂的抗性可能与 DBMRyR 的 G4946E、I4790M，*S. exigua* RyR 的 I4743M 以及 *C. suppressalis* RyR 的 G4910E 和 I4758M (均对应 FAWRyR 的 G4891、I4734) 突变有关。鳞翅目害虫 RyR 跨膜区域氨基酸序列同源度一般在 92% 以上[40]，本研究通过对比 WT FAWRyR 和 DBMRyR 跨膜区域的氨基酸序列，发现两者的同源度高达 92.55%；对比两者 RyR 三维模型，其 RMSD 值为 0.082，两者同源度极高。因此，本研究根据 DBMRyR 的 G4946E 和 I4790M 突变构建了 FAWRyR-E4891 和 FAWRyR-M4734 突变体，并分析了其与双酰胺类杀虫剂的结合模式。结果表明：FAWRyR 的 G4891 突变为 E4891 后，与双酰胺类杀虫剂的亲和力下降。目前已有研究结果表明，DBMRyR、*C. suppressalis* RyR 的 G4946E 和 G4910E (均对应 FAWRyR 的 G4891) 突变均可能导致其对双酰胺类杀虫剂产生抗性。因此，FAWRyR 的 G4891E 突变，可能是 FAW 对双酰胺类杀虫剂产生抗性的原因之一。在今后的研究中，需重点关注 FAWRyR 的 G4891E 突变。现有研究认为，FAWRyR 的 I4734M 突变也可能与 FAW 对氯虫苯甲酰胺和氟苯虫酰胺的抗性有关[21]。但本研究发现，FAWRyR 的 4734 号氨基酸不参与其与双酰胺类杀虫剂的结合，I4734 突变为 M4734 后 FAWRyR 与双酰胺类杀虫剂的亲和力并未下降。另外，Ma 等的研究结果表明：DBMRyR 的 I4790 (对应 FAW 的 I4734) 也不是其与双酰胺类杀虫剂形成亲和力的主要残基[24]。Boaventura 等在研究 FAWRyR 的 4734 号氨基酸突变与抗药性关系时所测田间幼虫样本数量有限，田间样本中 I4734M 突变频率较低[21]，I4734M 突变是否能够导致 FAW 对双酰胺类杀虫剂产生抗性仍需进一步研究探索。本研究也表明：G4891 在 FAWRyR 的保守区域，引起抗药性的 G4891E 突变可能为随机突变。除 G4891 外，K4642、V4890 和 R4896 与双酰胺类杀虫剂也可能存在氢键相互作用，同时也存在随机突变的可能性。因此，在后期研究中，应重点关注这 3 个氨基酸的突变，并进一步研究该突变与其对双酰胺类杀虫剂抗性的关系。另外在未来研究中，除了使用通过分子对接、氨基酸序列保守性分析的方法外，还可以考虑使用突变预测工具，如：AIMMS[41]、KRDS[42] 在线工具和生物学网络建模方法[43] 等预测其他随机突变与抗药性之间的关系。

目前，本研究仅通过同源建模方法构建了 FAWRyR 突变前后的三维模型，通过分子对接方法模拟 FAWRyR 突变前后与双酰胺类杀虫剂的结合模式，能够为分析 FAW 对双酰胺类杀虫剂的抗性机制提供理论依据。但是，分子对接的方法只能初步分析配体与受体之间的亲和力，而分子动力学模拟能更加准确地计算配体与蛋白受体的绝对结合自由能，其在药物结合靶标研究中被广泛应用[44-45]。LAMMPS、Gromacs、NAMD 等传统的分子动力学模拟软件操作繁琐，不适合进行大量的结合模式分析和结合自由能计算工作。目前也有一些图形化的分子动力学模拟在线工具 (如：LARMD[46]) 正在研发中，在未来研究中可以考虑运用这些工具进一步分析配体与受体之间的结合模式，计算亲和力。另外，本研究通过计算机模拟得出的理论计算结果并未经过实际的分子生物学实验验证，且同源建模和分子对接方法仅是计

算机模拟方法，无法完全准确模拟受体和配体之间的结合模式。在今后研究中，可以通过分子生物学实验进一步验证该文的理论计算结果，以及可以使用冷冻电镜或 X-ray 衍射法分析 FAWRyR 与双酰胺类杀虫剂复合体的结构，精确分析两者之间的结合模式。

4 结论

本研究通过蛋白质模建、分子对接等计算机分子模拟方法，分析了 WT FAWRyR 与双酰胺类杀虫剂的结合模式；根据已报道的鳞翅目害虫 RyR 的突变位点，构建 FAWRyR 突变体，并对其分析与 5 种双酰胺类杀虫剂的结合模式。主要结论有：

1) 通过同源建模的方法构建了 FAWRyR 的 C 端跨膜区域及其突变体的三维模型。

2) 通过对比分析 FAWRyR 突变前后与 5 种双酰胺类杀虫剂的结合模式，发现 G4891E 突变会导致 FAWRyR 与双酰胺类杀虫剂的结合亲和力下降、形成的作用力方式减少，从而导致 FAW 对双酰胺类杀虫剂产生抗性。

本研究从结构生物学角度初步分析了 FAW 抗双酰胺类杀虫剂的机理，能够为研究 FAW 对双酰胺类杀虫剂的抗性提供线索，同时为今后杀虫剂分子设计和结构修饰提供参考。在今后研究中可结合分子生物学实验、冷冻电镜或 X-ray 衍射法进一步验证 FAW 抗双酰胺类杀虫剂的机理。

参考文献 (References):

[1] 郭井菲, 何康来, 王振营. 草地贪夜蛾的生物学特性、发展趋势及防控对策[J]. 应用昆虫学报, 2019, 56(3): 361-369.
GUO J F, HE K L, WANG Z Y. Biological characteristics, trend of fall armyworm *Spodoptera frugiperda*, and the strategyfor management of the pest[J]. Chin J Appl Entomol, 2019, 56(3): 361-369.

[2] 姜玉英, 刘杰, 谢茂昌, 等. 2019 年我国草地贪夜蛾扩散为害规律观测[J]. 植物保护, 2019, 45(6): 10-19.
JIANG Y Y, LIU J, XIE M C, et al. Observation on law of diffusion damage of Spodoptera frugiperda[J]. Plant Prot, 2019, 45(6): 10-19.

[3] 张知晓, 户连荣, 刘凌, 等. 草地贪夜蛾的生物学特性及综合防治[J]. 热带农业科学, 2019, 39(9): 1-18.
ZHANG Z X, HU L R, LIU L, et al. Biological characteristics and integrated management of *Spodoptera frugiperda*[J]. Chin J Trop Agric, 2019, 39(9): 1-18.

[4] 崔丽, 芮昌辉, 李永平, 等. 国外草地贪夜蛾化学防治技术的研究与应用[J]. 植物保护, 2019, 45(4): 7-13.
CUI L, RUI C H, LI Y P, et al. Research and application of chemical control technology against *Spodoptera frugiperda*(Lepidoptera: Noctuidae) in foreign countries[J]. Plant Prot, 2019, 45(4): 7-13.

[5] IRAC. IRAC Mode of Action Classification Scheme[M]//IRAC, 2020.

[6] TEMPLE J H, POMMIREDDY P L, COOK D R, et al. Susceptibility of selected lepidopteran pests to rynaxypyr, a novel insecticide.[J]. J Cotton Sci, 2009, 13(1): 23-31.

[7] TOHNISHI M, NAKAO H, FURUYA T, et al. Flubendiamide, a novel insecticide highly active against lepidopterous insect pests[J]. J Pestic Sci, 2005, 30(4): 354-360.

[8] HUGHES K A, LAHM G P, SELBY T P, et al. Cyano anthranilamide insecticides[J]. WO, 2006.

[9] CORDOVA D, BENNER E A, SACHER M D, et al. Anthranilic diamides: a new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation[J]. Pestic Biochem Physiol, 2006, 84(3): 196-214.

[10] AMADOR F J, LIU S, ISHIYAMA N, et al. Crystal structure of type I ryanodine receptor amino-terminal *beta*-trefoil domain reveals a disease-associated mutation 'hot spot' loop[J]. PNAS, 2009, 106(27): 11040-11044.

[11] GUO L, WANG Y, ZHOU X, et al. Functional analysis of a point mutation in the ryanodine receptor of *Plutella xylostella* (L.) associated with resistance to chlorantraniliprole[J]. Pest Manag Sci, 2014, 70(7): 1083-1089.

[12] TROCZKA B, ZIMMER C T, ELIAS J, et al. Resistance to diamide insecticides in diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) is associated with a mutation in the membrane-spanning domain of the ryanodine receptor[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2012, 42(11): 873-880.

[13] GUTIÉRREZ-MORENO R, MOTA-SANCHEZ D, BLANCO C A, et al. Field-evolved resistance of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) to synthetic insecticides in Puerto Rico and Mexico[J]. J Econ Entomol, 2019, 112(2): 792-802.

[14] ZUO Y Y, MA H H, LU W J, et al. Identification of the ryanodine receptor mutation I4743M and its contribution to diamide insecticide resistance in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae)[J]. Insect Sci, 2020, 27(4): 791-800.

[15] BOLZAN A, PADOVEZ F E, NASCIMENTO A R, et al. Selection and characterization of the inheritance of resistance of *Spodoptera frugiperda*(Lepidoptera: Noctuidae) to chlorantraniliprole and cross-resistance to other diamide insecticides[J]. Pest Manag Sci, 2019, 75(10): 2682-2689.

[16] STEINBACH D, GUTBROD O, LÜMMEN P, et al. Geographic spread, genetics and functional characteristics of ryanodine receptor based target-site resistance to diamide insecticides in diamondback moth, *Plutella xylostella*[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2015, 63: 14-22.

[17] GUO L, LIANG P, ZHOU X, et al. Novel mutations and mutation combinations of ryanodine receptor in a chlorantraniliprole resistant population of *Plutella xylostella* (L.)[J]. Sci Rep, 2014, 4: 6924.

[18] 郭磊. 小菜蛾对氯虫苯甲酰胺抗性的分子机制 [D]. 北京: 中国农业大学, 2014.
GUO L. Molecular mechanism of chlorantraniliprole resistance in *Plutella xylostella* (L.)[D]. Beijing: China Agricultural University, 2014.

[19] MAMADALIEVA N, AKRAMOV D, OVIDI E, et al. Aromatic medicinal plants of the Lamiaceae family from Uzbekistan:

Ethnopharmacology, essential oils composition, and biological activities[J]. Medicines, 2017, 4(1): 8.

[20] SUN Y, XU L, CHEN Q, et al. Chlorantraniliprole resistance and its biochemical and new molecular target mechanisms in laboratory and field strains of *Chilo suppressalis* (Walker)[J]. Pest Manag Sci, 2018, 74(6): 1416-1423.

[21] BOAVENTURA D, BOLZAN A, PADOVEZ F E, et al. Detection of a ryanodine receptor target-site mutation in diamide insecticide resistant fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*[J]. Pest Manag Sci, 2020, 76(1): 47-54.

[22] 杨冬臣, 霍静倩, 张哲, 等. 反枝苋乙酰乳酸合成酶与烟嘧磺隆分子结合模式分析及抗性位点预测[J]. 农药学学报, 2019, 21(1): 26-34.
YANG D C, HUO J Q, ZHANG Z, et al. Binding modes of acetolactate synthase with nicosulfuron in *Amaranthus retroflexus* L. and potential resistance sites prediction[J]. Chin J Pestic Sci, 2019, 21(1): 26-34.

[23] 庄绪静, 曹雅忠, 李克斌, 等. 同源建模和分子对接方法的应用与发展 [C]//植保科技创新与病虫防控专业化——中国植物保护学会 2011 年学术年会论文集. 苏州, 2011: 637-643.
ZHUANG X J, CAO Y Z, LI K B, et al. Application and development of homologous modeling and molecular docking methods[C]// Scientific and technological innovation of plant protection and specialization of disease and insect control–China Society of Plant Protection Proceedings of the 2011 Annual Conference. Suzhou, 2011: 637-643.

[24] MA R, HAJI-GHASSEMI O, MA D, et al. Structural basis for diamide modulation of ryanodine receptor[J]. Nat Chem Biol, 2020, 16(11): 1246-1254.

[25] WANG X L, WU S W, YANG Y H, et al. Molecular cloning, characterization and mRNA expression of a ryanodine receptor gene from diamondback moth, *Plutella xylostella*[J]. Pestic Biochem Physiol, 2012, 102(3): 204-212.

[26] O'BOYLE N M, BANCK M, JAMES C A, et al. Open babel: an open chemical toolbox[J]. J Cheminform, 2011, 3(1): 33.

[27] PETTERSEN 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.

[28] DELANO W L. Pymol: an open-source molecular graphics tool[J]. {CCP4} Newsl Protein Crystallogr, 2002, 40: 1-8.

[29] MORRIS G M, HUEY R, LINDSTROM W, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility[J]. J Comput Chem, 2009, 30(16): 2785-2791.

[30] TROTT O, OLSON A J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading[J]. J Comput Chem, 2010, 31(2): 455-461.

[31] BIENERT S, WATERHOUSE A, DE BEER T A P, et al. The SWISS-MODEL Repository—new features and functionality[J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(D1): D313-D319.

[32] KROGH A, LARSSON B, VON HEIJNE G, et al. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes[J]. J Mol Biol, 2001, 305(3): 567-580.

[33] SALENTIN S, et al. PLIP: fully automated protein ligand interaction profiler[J]. Nucl Acids Res, 2015, 43(W1): W443-W447.

[34] BAILEY T L, ELKAN C. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers[J]. Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol, 1994, 2: 28-36.

[35] LASKOWSKI R A, MACARTHUR M W, MOSS D S et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures[J]. J Appl Cryst, 1993, 26(2): 283-291.

[36] 贾慧哲. 以鱼尼丁受体为靶标的小分子结合模式的计算机辅助研究 [D]. 天津: 南开大学, 2014.
JIA H Z. Computer aided research on the binding mode of small molecules targeting at ryanodine receptor[D]. Tianjin: Nankai University, 2014.

[37] YAN Z, BAI X, YAN C, et al. Structure of the rabbit ryanodine receptor RyR1 at near-atomic resolution[J]. Nature, 2015, 517(7532): 50-55.

[38] QI S Z, CASIDA J E. Species differences in chlorantraniliprole and flubendiamide insecticide binding sites in the ryanodine receptor[J]. Pestic Biochem Physiol, 2013, 107(3): 321-326.

[39] QI S Z, LÜMMEN P, NAUEN R, et al. Diamide insecticide target site specificity in the *Heliothis* and *Musca* ryanodine receptors relative to toxicity[J]. J Agric Food Chem, 2014, 62(18): 4077-4082.

[40] 孙丽娜, 芮昌辉, 袁会珠. 小菜蛾鱼尼丁受体基因克隆及序列分析[J]. 植物保护, 2012, 38(4): 118-123.
SUN L N, RUI C H, YUAN H Z. Molecular cloning and sequence analysis of ryanodine receptor gene in the diamondback moth, *Plutella xylostella*[J]. Plant Prot, 2012, 38(4): 118-123.

[41] WU F X, WANG F, YANG J F, et al. AIMMS suite: a web server dedicated for prediction of drug resistance on protein mutation[J]. Brief Bioinform, 2020, 21(1): 318-328.

[42] LEE A, HONG S, KIM D. KRDS: a web server for evaluating drug resistance mutations in kinases by molecular docking[J]. J Cheminform, 2018, 10(1): 20.

[43] CARBONELL P, TROSSET J Y. Overcoming drug resistance through in silico prediction[J]. Drug Discov Today: Technol, 2014, 11: 101-107.

[44] ZENG J, LI W H, ZHAO Y X, et al. Insights into ligand selectivity in estrogen receptor isoforms: molecular dynamics simulations and binding free energy calculations[J]. J Phys Chem B, 2008, 112(9): 2719-2726.

[45] SONODA M T, MARTÍNEZ L, WEBB P, et al. Ligand dissociation from estrogen receptor is mediated by receptor dimerization: evidence from molecular dynamics simulations[J]. Mol Endocrinol, 2008, 22(7): 1565-1578.

[46] YANG J F, WANG F, CHEN Y Z, et al. LARMD: integration of bioinformatic resources to profile ligand-driven protein dynamics with a case on the activation of estrogen receptor[J]. Brief Bioinform, 2020, 21(6): 2206-2218.

(责任编辑: 金淑惠)