科技前沿

害虫的基因沉默控制*

李 飞** 吴益东 韩召军

(南京农业大学植保学院 南京 210095)

Pest control through gene silencing. LI Fei**, WU Yi-Dong, HAN Zhao-Jun (*College of plant protection, Nanjing Agricultural University*, Nanjing 210095, China)

Abstract Gene silencing, a way of manipulating gene expression, is one of the most important breakthroughs in modern molecular biology. This article describes the history of gene silencing, how it works, and progress in its application on insects, including early attempts to apply it to pest control. The future potential of this novel technique for the control of insect pests is discussed.

Key words gene silencing, pest control

摘 要 作为现代分子生物学的重大突破性成果之一,基因沉默是人为调控基因表达的重要途径之一。本文介绍了基因沉默的发现历史、作用机制及其在昆虫中的研究进展,以及利用基因沉默原理进行害虫控制的探索,并展望害虫基因沉默控制的应用前景。

关键词 基因沉默,害虫控制

基因沉默是现代分子生物学研究的重大突破性成果,即发现了将外源双链 RNA 引入生物体内,可以阻止体内相应基因的表达,这一发现展示了基因表达的人为控制途径,其科学意义和实用价值不言而喻。因此,基因沉默很快成为生物学研究的热点,不仅在不同生物中得到验证,而且很快开发出 RNA 干扰技术,并迅速发展成为基因功能研究和反向遗传学研究的重要手段,同时也被成功地开发用于相关疾病的基因治疗中,如干扰癌基因促使癌细胞凋亡等[1,2]。

依据基因沉默理论,利用外源性双链 RNA 或小 RNA 沉默或破坏害虫体内的重要基因,可以导致害虫致死或发育停滞,从而达到控制害虫种群的目的。目前大量的研究已经证实昆虫体内也存在基因沉默现象,通过体腔注射和喂食双链 RNA 可以抑制靶标基因的表达。而许多重要基因的表达被抑制后,昆虫的生长发育表现异常,甚至直接产生致死作用[3,4]。因此,利用基因沉默原理,可以开发害虫防治的新途径[5]。

1 基因沉默的发现历史

基因沉默现象的发现可追溯到 1990 年,Napoli 和他的同事为了获得颜色更深的紫色牵牛花,将与花色素形成相关的酶基因转入矮牵牛花中。但出人意料的是,大部分转基因植物花色并没有加深,反而出现了白花,表明色素累积不仅没有增加反而减少,矮牵牛花本身的基因受到不同程度抑制或干扰。Jorgensen 等当时把这一现象称为共抑制[6]。随后,类似的现象不断被发现。1994 年,意大利的 Romano 和 Macino 将外源性类胡萝卜素基因 al2bino23 导入链孢霉(*Neurospora crassa*)中,结果发现转化细胞中 30% 的霉菌基因失活,并将其称之为基

* 资助项目:"973"前期预演项目(2009CB125902)、转基因专项(2009ZX08001—002B)。

**E-mail: lifei03@tsinghua.org.cn

收稿日期:2010-07-06,修回日期:2010-07-19

因的静息作用(quelling)[7]。1995 年,康乃尔大学的 Guo 和 Kemphues 在研究秀丽隐杆线虫 par-1 基因在胚胎发育中的功能时,发现正义链 RNA 能够高效地抑制基因表达,实现基因沉默,但并未对此现象做深入研究[8]。

突破性的进展发生在 1998 年。华盛顿卡耐基研究院的 Andrew Fire 和马萨诸塞大学医学院的 Craig Mello 等利用秀丽隐杆线虫作为研究材料,分别注射正义链、反义链和双链 RNA 来干扰靶标 Unc-22 基因,证实能够引发基因沉默现象的是双链 RNA[9]。此后,人们发现由双链 RNA 介导的基因沉默现象在不同进化地位的物种中高度保守,是生物体内沉默有害基因如转座子或精细调控基因表达的重要机制之一[10]。通过进一步开发,人们成功地实现从体外导入双链 RNA 引发高效的靶标基因沉默,通常称其为 RNA 干扰技术。2001 和 2002 年度,*Science* 杂志连续将相关的研究进展评为年度科学十大突破之一。2006 年,Andrew Fire 和 Craig Mello 因发现双链 RNA 能够引发基因沉默现象获 Nobel 生理与医学奖。

2 基因沉默的作用机制

一般认为,双链 RNA 在细胞内被 Dicer 酶加工成 21-23nt 的小片段 RNA,其中一条链与靶标基因的 mRNA 相结合,形成 RNA 介导沉默复合物(RNA induced silencing complex, RISC),降解 mRNA 或抑制蛋白翻译过程。为了维持双链 RNA 在细胞内的丰度和实现持续的基因沉默,双链 RNA 能够在 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RdRP)的作用下,进行自我扩增。RNA 介导沉默复合物(RISC)由 3 个主要蛋白组成,分别为 Dicer,Argonaute2 和 TRBP。其中 TRBP 起着连接 Dicer 和 Argonaute2 的功能[11,12]。Dicer 将双链 RNA 加工成小片段 RNA。然后,RISC 将双链小 RNA 分开,并利用其中一条链的小 RNA 分子去寻找靶标 mRNA。在单链小 RNA 与 mRNA 进行配对后,在 Dicer 和 TRBP 的辅助下,Argonaute2 对靶标 mRNA 进行降解。随后,RISC 复合物带着小片段 RNA 继续寻找下一个 mRNA 分子。

虽然基因沉默的核心机制是保守的,但不同物种中的基因沉默机制仍有较大的差异。系统干扰的概念首先是用来描述植物中基因转录沉默后的扩散,先是细胞摄取 dsRNA,然后扩散干扰的效应[13,14]。在果蝇中发现了 20 多种参与摄取 dsRNA 的基因,多数与已知的内吞功能有关。线虫具有系统性 RNA 干扰,即细胞可以通过 Sid-1 跨膜蛋白形成的 dsRNA 通道,吸收外界的 dsRNA[15~17]。赤拟谷盗也曾被认为具有系统性干扰,但赤拟谷盗虽然有 Sid-1,但研究证实 Sid-1 在赤拟谷盗并不介入系统干扰[18],赤拟谷盗吸收和扩散干扰 RNA 信号的机制,至今尚不清楚。重要的模式生物果蝇没有系统性干扰机制,除血细胞外,果蝇幼虫细胞不能吸收外界的 dsRNA,不能通过注射或饲喂昆虫来研究 RNA 干扰的机制,只能通过转基因来研究 RNA 干扰[19]。

3 昆虫中的基因沉默

昆虫具有基因沉默体系所需的核心元件,如 Dicer 酶,RISC 相关的一些蛋白等。相关的研究工作也证实能够在昆虫中引发 RNA 介导的基因沉默。

2003 年,Hoa 等人的研究结果表明岗比亚按蚊血细胞系中的基因沉默需要 dicer-2, Ago2 和 Ago3 蛋白基因的表达,而 RNAi 干扰信号无法扩散到非靶标部位,表明按蚊细胞系中不存在 RNA 依赖的 RNA 聚合酶[20]。Farooqui 等利用双链 RNA 干扰了蜜蜂触角的章鱼胺受体基因,并证明双链 RNA 能够从注射部位传送到其他神经细胞中[21]。Travanty 等人尝试利用转基因按蚊表达登革热基因的双链 RNA 去阻断按蚊传播登革热病毒,因为 siRNA 无法在中肠和唾液腺中表达,因此未获得完全成功[22]。2004 年,Tomoyasu 和 Denell 证实了向赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 幼虫体腔内注射绿色荧光蛋白(GFP)的 dsRNA 后,能在很短的时间内抑制 GFP 的基因表达且持续到蛹期或成虫期。同时对其幼虫 Tc-achaete-scute-

homolog (Tc-ASH) 进行 RNA 干扰会导致成虫形态上的缺陷,影响到整个身体而不仅仅是注射位点周围[23]。在胚胎期进行 RNA 干扰直接影响到胚胎,同时也有通过母体蛹的血腔进行双链 RNA 注射的 RNA 干扰研究[23]。Dong 等对蝗虫做了相关眼色素的 RNA 干扰实验,将合成的 vermilion 基因的双链 RNA 注射到蝗虫 *Schistocerca americana* 1 龄若虫体内,在以后的 10 ~ 14 d 里能观察到其眼色素的合成受到抑制[24]。Tang 等成功地干扰了表达于甜菜夜蛾脂肪体和卵巢组织中的海藻糖合成酶基因[25]。RNA 干扰技术还先后应用于叶蜂[26]、吸血蝽[27]、家蝇[28]、苹果褐卷蛾[29]、烟粉虱[30]、蟋蟀[31,32]、白蚁[33]、小菜蛾[34]、赤拟谷盗[35]、蟑螂[36]和草地贪夜蛾[37]中,通过干扰基因的表达来研究基因的功能。这些研究证实,分别可以通过浸泡、注射和喂食的方法在昆虫中实现基因沉默。

鳞翅目昆虫中有许多重要的农业害虫,要实现农业害虫的基因沉默控制,首先必须阐明其干扰 RNA 的传导机制。有关昆虫中是否存在系统性基因沉默,仍是一个有争议的问题。因为昆虫具有开放式循环和变态发育,因此血腔注射造成的沉默扩展以及幼虫注射影响成虫形态,不一定是系统性沉默。另外,作者利用生物信息学方法对 60 多种昆虫的 EST 进行了同源搜索,发现很多昆虫可能不存在 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RdRP),无法实现小 RNA 的体内自我扩增,在进行 RNA 干扰时,往往一次喂食或注射的效果不佳,需要连续的喂食或注射外源性 dsRNA 方才有效。作者的研究结果还表明,在许多昆虫中均存在 Sid - 1[38]。

总的来说,昆虫中的基因沉默机制与其他模式生物存在显著差异,特别是系统性 RNA 干扰和环境 RNA 干扰诱导基因沉默的机制,仍需要进一步的深入了解。

4　害虫基因沉默控制的相关研究

目前,绝大多数昆虫基因沉默的研究,都旨在利用反向遗传学的方法进行基因功能的分析。在公开报道的文献中,关于害虫基因沉默控制的前期探索性研究不多。

2007 年,害虫基因沉默控制有了突破性的进展。我国中科院上海生命科学研究所陈晓亚院士和孟山都公司在 *Nature Technology* 上同期发表利用基因干扰害虫某一重要基因而实现控制害虫或影响害虫发育的文章。Mao 等的研究表明,棉铃虫在取食表达自身 P450 基因的转基因拟南芥后,可以产生基因沉默效应,并导致体重明显下降[39]。孟山都公司的公开报道表明,玉米根虫的 ATP 酶基因被转基因玉米表达的小 RNA 抑制,在持续高剂量的小 RNA 作用下,有致死效果[40]。

此后,许多实验室在双链 RNA 的传送途径、导致害虫致死的重要基因筛选以及安全性方面开展了尝试性的研究工作。Whyard 等利用喂食小于 40nt 双链 RNA 的方法,选择不同物种特异性的序列片段,发现可以特异性杀死目标害虫而对近缘物种没有影响。这一研究结果表明,利用害虫基因沉默控制的方法具有很高的安全性[4]。通过喂食高剂量双链 RNA 的方法,Zhou 等干扰了白蚁的纤维素酶基因和 Hexamerin 基因,发现具有致死和致畸效果,显示 RNA 干扰可作为潜在的杀虫剂进行开发[33]。Zhang 等开发利用钠米颗粒传送 chitosan/AgCHS 双链 RNA 的方法,成功地干扰了岗比来按蚊中的两个几丁质合成酶基因,证明按蚊的 RNA 干扰是系统性,纳米技术可以用于害虫基因沉默控制中[41]。

5　害虫基因沉默控制的优势

相比于传统的害虫控制策略,害虫基因沉默控制具有以下优势:

(1)根据害虫基因序列的特异性,可以设计专一性基因沉默技术,同时由于 RNA 分子的不稳定性,不会出现残留污染问题,因此对环境生态安全和食品安全没有任何影响;

(2)防治对象的特异性极高,不会对其他昆虫特别是害虫天敌产生负面影响,有利于害虫生物防治和综合治理体系的实施;

(3)对由于基因突变产生的抗性问题,很容易通过改变小 RNA 的序列来解决,以变制变,因此不会产生严重的抗性问题。

6 未来研究发展的趋势

以上这些研究成果展示了利用基因沉默进行害虫控制的广阔前景,初步证实了害虫基因沉默控制的设想,但是离真正实现这一目标仍有很长的路要走,仍需开展大量的前期基础研究去深入揭示害虫基因沉默的机制,特别是系统性和环境 RNA 干扰的分子机理,以指导害虫基因沉默控制新策略的研究。

未来研究的发展趋势主要为:研究将外源性双链 RNA 传送到害虫体内的途径,包括胃毒剂的开发、微生物介导的 RNA 传送体系以及转基因植物介导的方法等。需进一步研究如何将这些方法应用于大田实践中;要系统研究害虫中的重要功能基因,并重点筛查害虫中经干扰后能够致死的基因;同时还必须加强害虫基因沉默的安全性研究,倘若外源性双链 RNA 进入非靶标害虫体内后,对天敌、哺乳动物包括人类等是否有危害?而目前的研究重点在于实验室内实现害虫基因沉默的有效控制,探索出大田应用的有效途径。

参 考 文 献

1 Meister G., Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double stranded RNA. *Nature*, 2004, **431**: 343 ~ 349.

2 Dykxhoorn D. M., Novina C. D., Sharp P. A. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2003, **4**: 457 ~ 467.

3 Kumar M., Gupta G. P., Rajam M. V. Silencing of acetylcholinesterase gene of *Helicoverpa armigera* by siRNA affects larval growth and its life cycle. *J. Insect Physiol.*, 2009, **55**: 273 ~ 278.

4 Whyard S., Singh A. D., Wong S. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2009, **39**: 824 ~ 832.

5 Daniel R. G., Gatehouse J. A. RNAi-mediated crop protection against insects. *Trends in Biotech.*, 2008, **26** (7): 393 ~ 400.

6 Napoli C., Lemieuz C., Jargensen R., *et al.* Introduction of achimeric chalcone synthase gene intopetunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell*, 1990, (2): 279 ~ 289.

7 Romano N., Macino G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol. Microbiol.*, 1992, **6** (22): 3 343 ~ 3 353.

8 Guo S., Kemphues K. J. ParA-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*, 1995, **81**(4): 611 ~ 620.

9 Fire A., Xu S., Montgomery M. K., *et al.* Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, **391**: 806 ~ 811.

10 Elbashir S. M., Harborth J., Lendeckel W., *et al.* Duplexes of 21 nucleotide RNA interference in cultured mammalian ce11s. *Nature*, 2001, **411**: 494 ~ 498.

11 Chendrimada T. P., Gregory R. I., Kumaraswamy E., *et al.* TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, 2005, **436** (7 051): 740 ~ 744.

12 Hammond S. M., Boettcher S., Caudy A. A., *et al.* Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*, 2001, **293**: 1 146 ~ 1 150.

13 Jennifer S., Hunter C. P. Environmental RNA interference. *Trends in Genet.*, 2008, **24** (6): 297 ~ 305.

14 May R. C., Plasterk R. H. RNA interference spreading in *C. elegans*. *Methods Enzymol.*, 2005, **392**: 308 ~ 315.

15 Marcel T., Robin C. M., Femke S., *et al.* Gene required for systemic RNA interference in *Caenorhabditis elegans*. *Cur. Biol.*, 2004, **14**: 111 ~ 116.

16 Roessel P., Brand A. H. Spreading silence with sid. *Genome Biol.*, 2004, **5**(2): 208.

17 Winston W. M., Molodowitch C., Hunter C. P., *et al.* Systemic RNAi in *C. elegents* requires the puptive transmenbrane protein SID-1. *Science*, 2002, **295**: 2 456 ~ 2 459.

18 Tomoyasu Y., Miller S. C., Tomita S., *et al.* Exploring systemic RNA interference in insects: a genome-wide survey for RNAi genes in *Tribolium*. *Genome Biol.*, 2008, **9**: 10.

19 Miller S. C., Brown S. J., Tomoyasu Y. Larval RNAi in *Drosophila*? *Dev. Genes Evol.*, 2008, **218**: 505 ~ 510.

20 Hoa N. T., Keene K. M., Olson K. E., *et al.* Characterization of RNA interference in an *Anopheles gambiae* cell line. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2003, **33**(9): 299 ~ 305.

21 Farooqui T., Vaessin H., Smith B. H. Octopamine receptors in the honeybee (*Apis mellifera*) brain and their

disruption by RNA-mediated interference. *J. Insect Physiol.*, 2004, **50**(8): 701 ~ 713.

22 Travanty E. A., Adelman Z. N., Franz A. W., *et al.* Using RNA interference to develop dengue virus resistance in genetically modified *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2004, **34**(7): 607 ~ 613.

23 Tomoyasu Y., Denell R. E. Larval RNAi in *Tribolium* (Coleoptera) for analyzing adult development. *Dev. Genes Evol.*, 2004, **214**(11): 575 ~ 578.

24 Dong Y., Dinan L., Friedrich M. The effect of manipulating ecdysteroid signaling on embryonic eye development in the locust Schistocerca Americana. *Dev. Genes Evol.*, 2003, **213**(12): 587 ~ 600.

25 Tang B., Chen J., Yao Q., *et al.* Characterization of a trehalose - 6 - phosphate synthase gene from *Spodoptera exigua* and its function identification through RNA interference. *J. Insect Physiol.*, 2010, **56**(7): 813 ~ 821.

26 Sumitani M., Yamamoto D. S., Lee J. M. Isolation of white gene orthologue of the sawfly, *Athalia rosae* (Hymenoptera) and its functional analysis using RNA interference. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2005, **35**(3): 231 ~ 240 .

27 Araujo R. N., Santos A., Pinto F. S., *et al.* RNA interference of the salivary gland nitrophorin 2 in the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) by dsRNA ingestion or injection. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2006, **36**(9): 683 ~ 693.

28 Eleftherianos I., Marokhazi J., Millichap P. J., *et al.* Prior infection of *Manduca sexta* with non-pathogenic *Escherichia coli* elicits immunity to pathogenic *Photorhabdus luminescens*: roles of immune-related proteins shown by RNA interference. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2006, **36**(6): 517 ~ 525.

29 Turner C. T., Davy M. W., MacDiarmid R. M., *et al.* RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. *Insect Mol. Biol.*, 2006, **15**(3): 383 ~ 391.

30 Ghanim M., Kontsedalov S., Czosnek H. Tissue-specific gene silencing by RNA interference in the whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2007, **37**(7): 732 ~ 738.

31 Moriyama Y., Sakamoto T., Akira M., *et al.* Functional analysis of the circadian clock gene period by RNA interference in nymphal crickets *Gryllus bimaculatus*. *J. Insect Physiol.*, 2009, **55**(5): 396 ~ 400.

32 Meyering-Vos M., Muller A. RNA interference suggests sulfakinins as satiety effectors in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *J. Insect Physiol.*, 2007, **53**(8): 840 ~ 848.

33 Zhou X., Wheeler M. M., Oi F. M., *et al.* RNA interference in the termite *Reticulitermes flavipes* through ingestion of double-stranded RNA. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2008, **38**(8): 805 ~ 815.

34 Bautista M. A., Miyata T., Miura K., *et al.* RNA interference-mediated knockdown of a cytochrome P450, CYP6BG1, from the diamondback moth, *Plutella xylostella*, reduces larval resistance to permethrin. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2009, **39**(1): 38 ~ 46.

35 Broehan G., Arakane Y., Beeman R. W., *et al.* Chymotrypsin-like peptidases from *Tribolium castaneum*: a role in molting revealed by RNA interference. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2010, **40**(3): 274 ~ 283.

36 Suazo A., Gore C., Schal C. RNA interference-mediated knock-down of Blag 1 in the German cockroach, *Blattella germanica* L., implicates this allergen-encoding gene in digestion and nutrient absorption. *Insect Mol. Biol.*, 2009, **18**(3): 727 ~ 736.

37 Griebler M., Westerlund S. A., Hoffmann K. H., *et al.* RNA interference with the allatoregulating neuropeptide genes from the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* and its effects on the JH titer in the hemolymph. *J. Insect Physiol.*, 2008, **54**(6): 997 ~ 1 007.

38 Xu W., Han Z. Cloning and phylogenetic analysis of sid-1 like genes from aphids. *J. Insect Sci.*, 2008, **8**: 30 .

39 Mao Y. B., Cai W. J., Wang J. W., *et al.* Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nat. Biotechol.*, 2007, **25**: 1 307 ~ 1 313.

40 Baum J. A., Bogaert T., Clinton W. *et al.* Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nat. Biotechnol.*, 2007, **25**: 1 322 ~ 1 326.

41 Zhang X., Zhang J., Zhu K. Y. Chitosan/double-stranded RNA nanoparticle-mediated RNA interference to silence chitin synthase genes through larval feeding in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). *Insect Mol. Biol.*, 2010: [Epub ahead of print]