

上升趋势`致使喷洒的剂量和次数不断上升`又引起了对环境的污染。药剂的大规模喷洒可能杀死生态圈中许多无害昆虫`并在食物链中富集`最终害及人类。

蚊类生活史中包括卵、幼虫、蛹和成蚊`个阶段。雌蚊在吸血和卵发育成熟后在适宜水体产卵。卵孵化后形成幼虫。由于蚊幼虫在水体中以细菌、藻类和其它有机颗粒为食`年代以后`人们开始使用一些芽孢杆菌控制蚊虫在水体中的孳生`切断其生活史`从而企图在整体上实现蚊虫控制。由于产生毒效的伴孢晶体蛋白随芽孢在水体中可迅速沉淀、脱离蚊幼虫生活的表层水面`以及紫外线对杀蚊毒素的灭活作用`这一类细菌杀虫剂面临一个持效短的问题。依据芽孢杆菌种类`一般持效期在`或`个星期左右。而反复喷洒不仅是人力所不及`也造成成本过高等问题。解决这一问题的办法之一是将有杀蚊幼活性的芽孢杆菌晶体蛋白基因导入蓝藻或其它水细菌中表达。

蓝藻是一类光合放氧的原核生物`广泛分布于各种自然水体`许多种类可漂浮生活于水体的上层。由于`年代以后建立了单细胞和丝状蓝藻的基因转移系统`利用蓝藻研制持效杀蚊幼的生物杀虫剂已成为可能。蓝藻天然生活于蚊虫孳生水体`如果经基因工程改造获得高杀蚊活力`可望大大提高生物杀虫剂对蚊虫控制的持续时间。

芽孢杆菌杀蚊幼蛋白基因

对蚊幼虫有毒杀作用的芽孢杆菌主要有球形芽孢杆菌`简称 C-1 和苏云金杆菌以色列亚种`简称 C δ 1。这两种杀蚊芽孢杆菌产生的伴孢晶体蛋白被幼虫吞食后在肠道碱性环境中溶解`从而被蛋白酶作用、激活`攻击中肠刷状缘上皮细胞膜`杀伤这些细胞`最终导致蚊幼虫死亡^{7,8}。C- 晶体蛋白主要含有 94K α 和`K β 两蛋白`编码这两个蛋白的基因在不同菌株中同向排列于染色体上一个`<9KS 左右的`>LDDD 片断^{7,8}。多数证据显示二基因或二蛋白同时存在才可对蚊幼虫发挥毒杀作用^{7,8}。与此不同`C δ 杀蚊毒性来自于 9 种晶体蛋白`推算分子量分别为 4`K α 、4`2K α 、`2K α 、`K α 和`K α 。编码这五个蛋白的基因`、`、`、`4`和`44`分布于一个 4`9KS 的大质粒上^{7,8}。这五个蛋白各自对蚊幼虫显示一定毒性`但混合时毒性大为提高`被认为存在协同效应^{7,8}。以上伴孢晶体蛋白基因均在芽孢发生阶段特异转录表达。C- 和 C δ 还存在杀蚊谱上的差异`前者对库蚊幼虫毒效最高`对按蚊幼虫毒效次之`对伊蚊幼虫无毒或低毒`而后者对伊蚊、按蚊幼虫毒效高`对库蚊幼虫毒效较弱。

在单细胞蓝藻表达杀蚊幼蛋白基因

462 年 G) 等人¹ = #ZL' #L' , #(-# 等人第一次提出以蓝藻表达芽孢杆菌杀蚊幼蛋白基因`并将来自 C- 496`株的`K β 蛋白基因导入`L!!`当时又称 A-1`发现经 = ()&Z / 4`和超声处理得到的细胞破碎液`见该文对方法的描述`对库蚊幼虫毒效与在大肠杆菌中表达同一基因相当。`M 半致死浓度为 4`ZNOE 蛋白`2M 可杀死全部被试幼虫^{7,8}。但她在发表该文时尚未意识到 C- 基因 94K α 和`K β 两蛋白共同作用才能发挥毒效`误以为所用`<: KS >`ZLDDD 片断仅编码一个`K β 蛋白。之后 3 (#JZ) 等人证实 = #ZL' #L' , #(-# 等所用克隆还含有一个

94K⁺ K@#蛋白基因⁷⁴⁸。另外,由于C-晶体蛋白基因在大肠杆菌等宿主表达时其产物被认为是结合于细胞膜或细胞壁上的,检测毒性往往以()&Z / 4[~]和超声打击相结合,以使毒素释放,故该文未报道完整蓝藻细胞是否有杀蚊幼活性。时隔4[~]年之后, P<F#Zz &M lZz J)&z 等人以蓝藻 # 启动子装置于来自C-[~]:[~]株的94K@#和[~]K@#蛋白基因上游,在另一单细胞蓝藻株 L!! :[~]4表达,检测到生活细胞对库蚊幼虫[~]2M半致死量为[~]<4 4^{~9%} //-NOE⁷⁴⁸。

除C-基因外有[~]种C&)伴孢晶体蛋白基因先后在单细胞蓝藻表达,但杀蚊幼活性均十分微弱。4626年![~]<3Zz-fl&M#Z#-lO\$#&和F<L#Z")O将[~]即\$在L!! :[~]当时称[~]% ! LA5 :l表达,结果细胞破碎液对伊蚊幼虫[~]2M半致死浓度高于4[~]OzNOE蛋白。免疫印迹检测发现表达产物在蓝藻细胞可被降解⁷⁴⁸。466[~]年[~]Q<! MlZzR&fJl (Z%M#)以光合基因启动子&_在:2[~]表达了[~]和4即\$和[~]。以表达[~]的完整生活细胞不能检测到任何毒性。而将细胞破碎后在4OzNOE蛋白浓度时[~]2M可杀死[~]5[~]S被测库蚊幼虫。表达4[~]的细胞则不显示任何毒效。以免疫印迹方法在蓝藻检测到了[~]和4[~]表达产物,但4[~]的表达十分微弱⁴(。这篇文章提出了以除草剂[~]抗性基因作为蓝藻基因工程选择标记[~]是值得注意的。

466[~]年[~]A<, fl(JM'和F<T<F&U'Z- I(<将44即\$)与蓝藻藻蓝蛋白基因!进行融合,利用!启动子和核糖体结合位点、起始密码子在L!! :[~]"% ! i表达,首次报道了蓝藻完整生活细胞的杀蚊幼活性。但其杀蚊幼效果微弱。每4[~]M饲喂一次[~]至:L才杀死被测库蚊幼虫⁷⁴⁸。若按Q>B标准测试方法[~]可以认为没有毒杀能力。免疫印迹实验证明融合蛋白在蓝藻得到了表达。

虽然Q<! MlZzR&fJl (Z%M#)未能检测到表达[~]的蓝藻的活细胞杀蚊幼毒效,T<Fl/&- A#K等人466[~]年报道了以[~]*启动子加强该基因在L!! :[~]6[~]的表达。以刚孵化的库蚊幼虫测试毒性,如果每[~]M饲喂一次,观察到在4[~]% //-NOE以上浓度时,[~]M可杀死约:[~]~[~]S的幼虫。以蓝藻![~]+4启动子和起始密码子与之融合也得到表达,以相同细胞浓度[~]2M可杀死约6[~]S幼虫⁷⁴⁸。有趣的是T<Fl/&- A#K等人进一步发现[~]基因转录产物在蓝藻中迅速降解,Gf(&M (Z杂交检测不到[~]基因全长,[~]而只有大量较小分子量的降解产物,相反在大肠杆菌中可以检测到[~]全长,[~]。基因的表达也受到藻龄的影响^{74,8}。

在丝状固氮蓝藻表达杀蚊幼蛋白基因

早期国外研究者仅采用单细胞蓝藻表达杀蚊幼蛋白基因主要是基于对蚊幼虫取食能力的考虑。单细胞蓝藻体积小,易于被水流带入蚊幼虫消化道。D<=M'(" '&#/观察了若干单细胞蓝藻被淡色库蚊和冈比亚按蚊幼虫取食和消化的情况。被食单细胞藻在4M内可被消化并排出消化道,而对丝状分枝的[~]则需要[~]至[~]<9M才能完成这一过程⁷⁴²⁸。本研究小组观察了蚊幼虫对单细胞蓝藻、丝状不分枝蓝藻和丝状结块蓝藻的取食情况,观察到除单细胞蓝藻外,丝状不分枝蓝藻如鱼腥藻1,4[~]同样可以被幼虫迅速以滤食方式摄入肠道并被消化,依赖鱼腥藻[~]库蚊幼虫可完成整个发育过程并羽化

为成蚊。而蚊虫对生长成块状的蓝藻取食较慢^{7,46,8}。

根据这一观察`在当时国外以单细胞蓝藻表达杀蚊幼蛋白基因不成功的背景下`我们小组开始尝试丝状不分枝的固氮蓝藻。在蓝藻表达芽孢杆菌基因`尤其是在芽孢分化过程中特异表达的基因`一个普遍接受的想法即是应以强启动子或蓝藻内源启动子加强其转录水平。利用 13= 氯霉素乙酰基转移酶¹ 报告基因筛选到有较强启动子活性的鱼腥藻 @G3 片段克隆`试图加强杀蚊幼基因在鱼腥藻的表达。结果携 C- 94K@# 和 `K@# 蛋白基因的鱼腥藻`生活细胞不经任何处理直接用于测试对淡色库蚊幼虫毒效`显示了高杀蚊活性。` 4` %//NOE 浓度的藻悬液`2M 可杀死全部库蚊幼虫`而半致死剂量为 4V` 4` %//NOE^{7~8}。免疫印迹显示杀蚊幼鱼腥藻中 94K@# 和 `K@# 两蛋白以约 4 4 的比例获得表达`并且无降解迹象。对 C- 基因克隆片段不同区域进行缺失`观察到仅携带 94K@# 或 `K@# 蛋白基因时鱼腥藻无任何毒效`将两种藻细胞相混合则毒效恢复*而去除 94K@# 蛋白基因上游序列时鱼腥藻杀蚊幼活性降低一百倍以上^{7,48}。可见 C- 杀蚊基因的表达式`至少是 94K@# 蛋白基因的表达式`主要依赖于自身上游序列而不是克隆于载体上的蓝藻内源启动子或其它未知启动子。94K@# 蛋白基因上游序列中含有在鱼腥藻中有效发挥作用的启动子、高拷贝运载体质粒和杀蚊幼蛋白在鱼腥藻中的稳定性可能共同决定了基因工程鱼腥藻的高杀蚊毒效。

由于蚊虫孳生水体的多样性`仅以一种鱼腥藻可能难以适应在不同水质发挥持效控制蚊虫的作用。通过对`株丝状固氮蓝藻的筛选`已将携有 C- 94K@# 和 `K@# 蛋白基因的质粒导入`种鱼腥藻和念珠藻表达`均获得高杀蚊毒效^{7,4~8}。其中一种在培养条件下结块漂浮生长`对大量生产十分有利。

如同球形芽孢杆菌`含 94K@# 和 `K@# 蛋白基因的鱼腥藻对淡色库蚊幼虫毒效很高`对中华按蚊幼虫毒效较低`而对白纹伊蚊幼虫则需要较高细胞浓度才能显示毒效^{7~8}。在有淡色库蚊幼虫孳生的水体中喷洒万分之一基因工程蓝藻培养液一般在`L 后观察到幼虫全部死亡^{7~8}。在户外需要较长时间杀死全部幼虫是由于幼虫龄期不齐。在实验室内以 D`龄末幼虫分别测试毒效`观察到杀蚊幼蓝藻毒性随测试幼虫龄期增加而递减^{7~8}。喷洒杀蚊幼鱼腥藻的水体库蚊幼虫消失后一般可持续达`个月或更长时间没有库蚊幼虫孳生^{7,4~8}。与球形芽孢杆菌或苏云金杆菌制剂相比较持效有很大的提高。在固氮蓝藻大量生产技术中可将藻体风干制成干藻粉保藏。试验表明`杀蚊幼鱼腥藻干粉仍具有高杀蚊毒效`但在户外使用应大大提高喷洒剂量^{7,48}。

以色列 C'Z`+fl(l)Z`大学 F<C#l-)\$# 和 3<W#()&K" 合作从 466`年开始试图将杀蚊幼基因导入`但由于未能成功建立适合该种的基因转移系统而未能成功。466`年笔者在这一小组短期工作期间建议先使用鱼腥藻 L!!`4~`株观察表达效果`并与吴晓强等人尝试表达`、`、44`\$、`\$和`\$) 基因`但毒效较低^{7,9}。466`年吴晓强等人又以光合基因启动子 &`和 =`噬菌体基因启动子 &`串联表达`和 44`结果获得成功^{7,10}。其中表达`和 44`两个基因的鱼腥藻`4~`株对埃及伊蚊幼虫`M 半致死浓度是 2<9×4`%//NOE* 而仅表达`基因的鱼腥藻`M 半致死浓度为 4`%//NOE 以上。对此吴晓强等人认为`44`和`的协同作用大大增强了杀蚊幼毒效。这一研究也显示`基于 J@fi 4 鱼腥藻复制位

点的质粒在无抗菌素的选择压力时可稳定传代。我国华中农业大学喻子牛教授的研究小组将 44 基因导入鱼腥藻, 4^{7~8} 以免疫印迹手段检测到了表达。但可能由于未装置任何强启动子, 活细胞未检测到杀蚊幼毒效^{7,8}。基于这一结果以及其它实验室在单细胞蓝藻的实验结果, 可以认为与 C-94K 和 C₁K 蛋白基因不同, C₂ 基因 44 和 等自身不携带在蓝藻有效表达的启动子。

! 杀蚊幼蓝藻进一步研究的方向

在丝状固氮蓝藻成功表达 C- 和 C₂ 杀蚊幼蛋白基因为蓝藻用于蚊虫防治奠定了基础。目前已有基因转移系统的鱼腥藻在培养基中多数漂浮能力较差, 但是户外水体喷洒实验显示杀蚊幼蓝藻仍然可持续抑制蚊虫孳生达 个月之久, 表明野外条件下鱼腥藻的漂浮行为可能与在实验室液体培养迥异。以基因标记技术跟踪杀蚊幼鱼腥藻在水体中的分布和繁殖情况将有利于进一步揭示杀蚊幼鱼腥藻在水体中的滞留情况。制成干藻粉的杀蚊幼蓝藻可满足长途运输的需要, 甚至出口非洲、南美和若干东南亚国家用于蚊虫和流行病控制。但距离这一目标尚需解决以下几个技术问题

4) 在更多漂浮能力强、利于工厂化生产的品种建立基因转移系统。丝状固氮蓝藻基因转移系统最早于 1962 年由 L' (Q1/K 等人建立^{7,28}。业已证明这一类群蓝藻妨碍基因转移的因素主要是细胞内存在的多种限制性内切酶^{7,68}。在携有相应甲基化酶基因的大肠杆菌中预先修饰保护穿梭质粒, 再以接合转移方式导入鱼腥藻可使几乎全部藻细胞被外源基因转化。

5) 导入多重杀蚊幼毒素基因。仅表达一种杀蚊幼毒素基因的蓝藻在环境中长期滞留可能会导致蚊虫抗性的发生, 而如果同时表达多种杀蚊幼毒素基因则可能防止出现抗性。C₂ 制剂使用已有 年历史而从未有发生蚊虫抗性的情况报道, 可能主要归功于有 9 个杀蚊幼蛋白发挥作用。另外从提高杀蚊毒效、扩大杀蚊谱的角度来看, 在蓝藻中表达 C- 和 C₂ 两个来源的多种杀蚊幼蛋白基因也是十分有利的。

6) 用非抗菌素选择标记代替目前的抗菌素标记。公众舆论往往对在环境中释放大量的抗菌素标记基因的重组微生物不能接受, 主要是担心这些标记横向传递给环境中的致病菌, 最终可能导致临床上的各种抗菌素均无法杀死致病菌。出于谨慎的考虑而不仅是应付公众的反对, 以非抗菌素标记如重金属离子抗性基因、除草剂抗性基因等代替抗菌素标记, 也是十分必要的。因为大规模地释放一种携有抗菌素标记的重组微生物可能确实会加速环境中这种基因在微生物间的传递。

参考文献

- 748 = #ZL' #L' , #(-#%G' L' # = 1((' X' FYW/O#R&(' I<TZJ(-))Z1[&M' /(U)Q)L# / Z'Z' I[! 496°,)Z &M' %' #Z1S#%& Q1O A~7I8< . "/ " / 462. " #0°6: -°62
- 7~8 /fl /' P1Zz A' >fl ?<>)ZM/(U)Q)L# /#(Q)U&' I[)Z&%' ('Q)OS)Z#Z&%' #Z1S#%& Q1O 3Z#S#Z# -J<L! ! 4~' 'ZJ(-)Zz + 'Z' 94 #ZL + 'Z' ' 1[&M' C#Q)/fl -JM# Q1O ~6.7I8<+0. . "# 466~ " \$0~ -~9"
- 7~8 El X' @U) P F' !M&Z) -HL' '&#<, 1/'%fl/(Z'Z' &%' I[%' #Z1S#%& (#0Z' \ #U'Zfl')Z S) &' %Z1/I z"7I8<1 " " , 466:~!!0999-9: °
- 7~8 董桂馨< 卫生杀虫剂应用技术7, 8< 北京0化学工业出版社> 4662

