

基因编辑技术在害虫防治中的应用

殷玥^{1,2} 李媛媚² 黄娟³ 开振鹏² 周昌艳¹ 陈珊珊¹

(1.上海市农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所,中国上海 201403;

2.上海应用技术大学化学与环境工程学院,中国上海 201418;

3.中国科学院动物研究所,中国北京 100101)

【摘要】本文介绍了三代基因编辑技术 ZFN、TALEN 及 CRISPR/Cas9 的作用机制和技术关键,对利用基因编辑技术进行昆虫研究相关的靶标选择案例与实际应用实例进行介绍。针对各项实际案例的研究结果,系统地对该项技术可能出现的问题进行分析阐述,展望其在害虫防治方面的应用前景。

【关键词】基因编辑;害虫防治;CRISPR/Cas9

Genome editing and its application in pest control

YIN Yue^{1,2} LI Yuan-mei² HUANG Juan³ KAI Zhen-peng² ZHOU Chang-yan¹ CHEN Shan-shan¹

(1.Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Institute for Agrifood Standards and Testing Technology, Shanghai 201403, China;

2.Shanghai Institute of Technology, College of Chemical and Environmental Engineering, Shanghai 201400, China;

3.Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

【Abstract】This review introduced the genome editing technology and summarizes the application of genome editing in pest control. Then the accounts of prospects and challenges for the use of these technology for pest control were presented. This review provided the reference for the further application of genome editing in pest control.

【Key words】Gene silencing; Genome editing; Pest control

0 前言

每年,由于害虫带来的经济损失和用来控制害虫的杀虫剂花费都高达上百亿元。同时,杀虫剂的长期使用也会带来污染和抗药性等诸多问题。害虫的安全、有效防治一直是植物保护研究中的主要关注点。

基因技术很早就被昆虫学家作为研究的重要工具。前期主要采用化学诱变剂和辐射等方式。自 1980 年转座子发现以来,人们对于昆虫基因的靶向修饰变得越来越方便和精确。通过基因的重组和编辑能达到以低毒的方式对害虫的数量进行控制。目前常用技术主要包括:转基因和基因编辑技术。转基因技术已发展的较为完善,并已广泛运用在植物保护中。近年来,基因编辑技术得到了极大的发展。人们通过注射的手段将外源基因导入到昆虫体内,敲除、修改或加入某种特定基因,从而影响其正常生长。基因编辑技术应用在诸多昆虫上都得到了较好的验证效果。通过基因层次的改造对害虫生长发育进行调控为人们提供了一套安全有效的害虫防治方法。

本文就基因编辑技术 ZFN、TALEN 及 CRISPR/Cas9 的概况及在害虫防治方面的应用进行综述。

1 基因编辑技术概况

第一代基因编辑技术采用锌指蛋白核酸酶(ZFN)。它是一种人工改造的核酸内切酶,结合在 DNA 的特定位点,由非特异性核酸酶剪切,实现在 DNA 特定位点的定点断裂。第二代基因编辑技术采用植物病原菌黄单胞菌属(Xanthomonas)分泌的蛋白激活因子样效应物核酸酶(TALENs)识别特异性的 DNA 碱基对,并与其结合进行切割,导入新的遗传物质。尽管相比于 ZFNs,TALENs 要更加简便,但仍需要大量的基因合成和建构。第三代基因编辑技术 CRISPR/Cas9 是细菌和古细菌为应对病毒的进攻所演化而来的获得性免疫防御机制。与 ZFNs 和 TALENs 不同的是,CRISPR/Cas9 基因编辑不需要重复的设计和表达 Cas9 蛋白,只需要产生目的特异性的向导 RNA(gRNAs)与 Cas9 蛋白结合。近期,针对 CRISPR-Cas9 技术的脱靶效应,加州大学伯克利分校的詹妮弗·杜德纳研究团队证实,抗 CRISPR 蛋白 AcrIIA4 能将脱靶效应降低四分之一,而整个过程中目标位点的基因编辑没有受到丝毫影响。

2 基因编辑技术在昆虫研究领域的进展

ZFNs 在鳞翅目、直翅目、双翅目昆虫中都成功实现了基因编辑。Merlin C 等人^[1]以黑脉金斑蝶的 Dpery2 基因为靶标,通过体外合成的 mRNA 注射,成功实现了基因敲除,在细胞 S 期的敲除率最高可达 88%。McMeniman 等人^[2]以埃及伊蚊的 AaGr3 基因为靶标,不仅实现了基因敲除,还进行了基因片段插入的实验,结果得到基因敲除的率达

到 43.8%,插入的结果仅为 0.49%。但在果蝇中,Rosy 基因的插入实验成功率可达到 60%^[3]。基因的插入和敲除在细胞周期的不同阶段得到的结果也不同。由于设计有效的 ZFNs 存在困难,且成本较高,目前在昆虫研究上应用较少。

TALENs 技术在鳞翅目、直翅目、双翅目昆虫的基因编辑中都有成功的案例。Xu 等人^[4]以家蚕为研究对象,以性别决定相关基因为靶标,整合包含系统组件的相关基因,基因敲除率达到 100%。除了转基因的方式,TALENs 也可以通过注射体外合成的 mRNA 进行基因敲除,在埃及伊蚊中敲除率可达到 90%^[5]。

CRISPR/Cas9 系统虽然才被人们发现不久,但已经受到诸多研究者的关注。目前研究对象主要包括鳞翅目、直翅目、半翅目昆虫。目前,人们对于提高基因编辑效率采用了三种不同的方案:(1)引入质粒载体,体外编码 Cas9 的 RNA 和 sgRNA^[6];(2)注射质粒 sgRNA 相关 DNA 到转基因后的果蝇体内^[7];(3)建立一个包含 Cas9-sgRNA 的转基因模型^[8]。根据比较,Shih-Ching Lin 得出了建立生物模型更为高效的结论。Gratz SJ 等人还尝试将该系统与 Cre-loxP 系统联合使用,筛选效率更高。该系统关键在 3xP3-RFP 基因,相比于过去的基因插入技术,Cre-loxP 与 CRISPR/Cas9 联用能有效提高基因编辑的成功率,为解决脱靶率高这一问题提供了解决手段。Honglun Bi 等人^[9]以鳞翅目害虫斜纹夜蛾为研究对象,利用 Cas9 对其 Slabd-A 基因进行编辑,最终成功地抑制了该基因的表达。他们发现,对幼虫生长相关基因的编辑对害虫起到致命的作用。并且研究还开创了一种有效的显微注射方法,在注射后,死亡率大大提升。

近期,主要由埃及伊蚊传播的寨卡病毒在南美,尤其在巴西大爆发。目前生物技术公司 Oxitec 已经研发出转基因蚊子。他们通过基因编辑技术将 Oxitec 基因插入蚊子体内,使得其后代未成为成虫就死亡。转基因的埃及伊蚊在被放入野外后与雌蚊交配,产生的后代无法活到成年。该公司试验点的蚊子能减少 90%。这是直接将基因编辑技术应用到害虫防治领域的一次尝试,其结果显示基因编辑作为一种新的害虫防治手段具有可行性。

3 基因编辑技术在害虫防治方面的应用前景及问题

基因编辑技术,尤其是 CRISPR/Cas9 为昆虫学家提供了一种控制害虫的新方法。通过基因编辑技术能产生新基因型或产生与其他昆虫相似的基因型。在对蚊子的研究中,研究者一直在寻找一种消除或改变蚊子表现型的方法^[10]。Galizi R 等人^[11]利用核酸内切酶表达具有组织特异性和阶段特异性的基因,表达该基因的雄性按蚊产生的后代都为含 Y 染色体的雄性。由此形成了一个性别比例失衡的系统,有效降低了按蚊的种群数量。基因编辑的目的也可能是改变害(下转第 42 页)

※基金项目:国家农产品质量安全风险评估重大专项(GJFP2017002)。

作者简介:殷玥,女,在读硕士研究生,研究方向为 RNA 干扰和基因编辑技术应用于昆虫防治。

生自由组合(3人一组)成立学习小组,甲负责拼写平假名,乙负责拼写片假名,丙负责出题和检查两人的拼写正确与否,三人共同完成五十音图、片假名的学习任务。以五十音图的第一行a行假名为例,首先由甲和乙分别默写平假名あ、い、う、え、お和片假名アイウエオ,由丙检查默写是否正确,然后丙随机读出由a行假名构成的单词[ai],甲和乙分别听写出对应的平假名“あい”和片假名“アイ”,再由丙检查听写是否正确。老师负责指出拼读和听写过程中未被发现的错误,并对完全正确的小组进行表扬,这样既降低了学习难度,又增加了趣味性,让学生快乐且快速地掌握了五十音图。

在学习新单词时,让学生自由组合(3人一组)成立学习小组,甲负责拼读单词,乙负责拼写单词,丙负责检查甲的拼读和乙的拼写,并解释中文意思,三人共同完成新单词的学习任务。以新版《标准日本语》(初级上册)第1课的生词为例,甲拼读“先生(せんせい)”,乙在黑板上写出“先生(せんせい)”,丙检查甲的语音语调和乙的假名书写是否正确,然后解释中文意思为“老师”,而不是“先生”;甲拼读“アメリカ人”,乙在黑板上写出“アメリカ人”,丙检查甲的语音语调和乙的假名书写是否正确,然后解释中文意思为“美国人”,其中“アメリカ”是美国的意思,源自英文单词 America。老师负责指出拼读、书写和解释过程中未被发现的错误,根据需要可对部分单词作进一步的解释说明合举例,并对完全正确的小组进行表扬。这样既避免了老师带读单词的枯燥,又加强了学生对生词的记忆,变被动为主动,提高了生词学习的效率。

3.2 合作学习模式下的课文朗读与情景对话

在学习基本课文时,让学生自由组合(2人一组)成立学习小组,两人分别扮演基本课文中甲和乙的角色,模仿教学视频,声情并茂地朗读课文。以新版《标准日本语》(初级上册)第2课的基本课文为例,利用现场的道具,甲提问:“これはテレビですか。”乙回答:“いいえ、それはテレビではありません。パソコンです。”这样既有利于准确地把握日语的语音语调,又有利于体会日语的文化特色,让学生更快地掌握了日语的基本句式。

在学习应用课文时,根据具体情境需要,让学生自由组合(2-4人一组)成立学习小组,模仿应用课文的场景,进行多姿多彩的会话表演。以新版《标准日本语》(初级上册)第3课的应用课文为例,甲和乙扮演顾客去超市购物,丙扮演超市导购员,课桌上摆放铅笔、本子、伞

等日常用品。甲提问:“あのう、傘はどこですか”。丙回答:“傘ですか。そちらです”。甲提问:“いくらですか”。丙回答:“1500円です”。乙提问:“鉛筆はどこですか”。丙回答:“鉛筆はこちらです”。乙提问:“いくらですか”。丙回答:“500円です”。老师负责指导语音、语调和语法等,并对表演出色的小组进行表扬。这样既增加了课堂的趣味性,又锻炼了学生的日语应用能力,切实提高了学生的听力和口语水平。

通过采用合作学习模式,研究生二外日语教学取得了以下成果:1)发音阶段的学习从以往的12课时缩短至8课时,大大提高了学习效率;2)学生参与课堂的比重从以往的20%左右增加到50%左右,大大活跃了课堂气氛;3)以往的学生读写能力强但听说能力弱,现在的小学生听说读写译同步发展,大大提高了听力和口语水平。

同时,在尝试合作学习模式进行二外日语教学的过程中,也存在一些需要注意的问题:1)合作学习小组成员之间分工必须明确,适当的时候可以转换角色,保证每一名成员都能得到全面的锻炼,从而整体提高全班同学的日语综合水平;2)老师需要根据每一个学生的日语水平来设计难度适中的学习任务,做到既不打消学生的学习积极性,又能够适当提高其日语水平;3)老师需要根据需要加以引导,控制好课堂节奏,确保合作学习的效果。

4 结语

综上所述,本文以湖南工程学院为例,从问卷调查和课堂实践两个方面考察了研究生二外日语教学中合作学习模式的可行性,得出以下结论:1)理工科研究生注重日语学习的实用性与高效性,注重口语与听力水平的提高,对“合作学习模式”兴趣浓厚,可以在日语选修课上适当采用合作学习模式来教学;2)采用合作学习模式教学,能够提高学习效率、活跃课堂气氛、提高听力和口语水平等;3)运用合作学习模式教学,需要注意分工明确、难度适中、控制节奏等。

【参考文献】

- [1]侯巧红.高校日语选修课程教学改革的探索与实践[J].开封教育学院学报,2011(3):60-62.
- [2]国艳萍.合作学习模式在《综合日语》教学中的实践与探究[J].北京城市学院学报,2012(6):67-70.

[责任编辑:田吉捷]

(上接第51页)虫的表现型,使之无害。另外利用基因编辑技术,研究害虫基因功能,发现的杀虫剂靶标,也是行之有效的害虫防治策略之一。

基因编辑技术应用于害虫防治上具有很大的潜力,但一项技术被用于实践还要考虑两方面的因素:(1)是否有相应的技术将此系统递送到特定的细胞,并在特定的阶段得到表达。(2)目标物种能否控制交配和筛选过程并进行基因分析。

目前,基因编辑技术缺乏成功的实践范例以及能广泛使用的框架。在一些范例中,最终并没有产生基因突变,未得到预期的效果^[12]。对于基因编辑技术,不仅要考虑其有效性,还要考虑对环境带来的影响。这些都还有待进一步研究。

4 结语

利用生物手段对害虫进行控制能有效解决抗药性和化学农药产生的污染等问题,可能是未来害虫防治的主要手段,而基因编辑的效果已在研究阶段得到了很好的验证,相信随着研究的进一步深入,该项技术存在的问题能得到解决并广泛应用到害虫的防治中。同时,我们认为基因编辑技术可以与常规的化学农药联用,在害虫防治中共同发挥作用。

【参考文献】

- [1]Merlin C,Beaver LE,Taylor OR,Wolfe SA,Reppert SM.Efficient targeted mutagenesis in the monarch butterfly using zinc-finger nucleases[J].Genome Res 2013,23:159-168.
- [2]McMeniman CJ,Corfas RA,Matthews BJ,Ritchie SA,Vosshall LB.Multimodal integration of carbon dioxide and other sensory cues drives mosquito attraction to humans[J].Cell 2014,156:1060-1071.
- [3]Beumer KJ,Trautman JK,Mukherjee K,Carroll D.Donor DNA utilization

during gene targeting with zinc-finger nucleases [J]. G3-Genes Genomes Genetics 2013,3:657-664.

[4]Xu J,Wang Y, Li Z, Ling L, Zeng B, James AA, Tan A, Huang Y. Transcription activator-like effector nuclease (TALEN)-mediated female-specific sterility in the silkworm, Bombyx mori[J]. Insect Mol Biol 2014, 23:800-807.

[5]Basu S, Aryan A, Overcash JM, Samuel GH, Anderson MAE, Dahlem TJ, Myles KM, Adelman ZN. Silencing of end-joining repair for efficient site-specific gene insertion after TALEN/CRISPR mutagenesis in Aedes aegypti [J]. Proc Natl Acad Sci U S A 2015, 112:4038-4043.

[6]Gratz SJ, Ukken FP, Rubinstein CD, Thiede G, Donohue LK, Cummings AM, O'Connor-Giles KM. Highly Specific and Efficient CRISPR/Cas9-Catalyzed Homology-Directed Repair in Drosophila[J]. Genetics 2014, 196:961-971.

[7]Gratz SJ, Cummings AM, Nguyen JN, Hamm DC, Donohue LK, Harrison MM, Wildonger J, O'Connor-Giles KM. Genome engineering of Drosophila with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease[J]. Genetics 2013, 194:1029-1035.

[8]Kondo S, Ueda R. Highly improved gene targeting by germline-specific Cas9 expression in Drosophila [J]. Genetics 2013, 195:715-721

[9]Honglun Bi, Jun Xu. CRISPR/Cas9-mediated targeted gene mutagenesis in Spodoptera litura [J]. Insect Science, 10.1111/1744-7917.12341. (2015)

[10]Burt A. Heritable strategies for controlling insect vectors of disease [J]. Philos Trans R Soc B Biol Sci 2014, 369:20130432.

[11]Galizi R, Doyle LA, Menichelli M, Bernardini F, Deredec A, Burt A, Stoddard BL, Windbichler N, Crisanti A. A synthetic sex ratio distortion system for the control of the human malaria mosquito [J]. Nat Commun 2014, 5:3977.

[12]Araki M, Nojima K, I shii T. Caution required for handling genome editing technology [J]. Trends Biotechnol 2014, 32:234-237.

[责任编辑:朱丽娜]