

靶向 *gat* 基因的 shRNA 重组微藻防控白纹伊蚊

唐欣欣¹, 邓晓东^{2,4}, 黄小丹³, 杨思琪¹, 薛春梅^{1*}, 费小雯^{3*}

1 佳木斯大学 生物与农业学院, 黑龙江 佳木斯

2 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海南省海洋生物资源功能性成分研究与利用重点实验室,
海南 海口

3 海南医科大学 基础医学与生命科学学院, 海南 海口

4 中国热带农业科学院湛江实验站, 广东 湛江

唐欣欣, 邓晓东, 黄小丹, 杨思琪, 薛春梅, 费小雯. 靶向 *gat* 基因的 shRNA 重组微藻防控白纹伊蚊[J]. 微生物学报, 2025, 65(5): 2240-2251.

TANG Xinxin, DENG Xiaodong, HUANG Xiaodan, YANG Siqu, XUE Chunmei, FEI Xiaowen. Recombinant expression of shRNA targeting *gat* in microalgae for controlling *Aedes albopictus*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(5): 2240-2251.

摘要: 【目的】探讨利用转基因微藻防控传播登革热等疾病的伊蚊的技术可行性。【方法】以伊蚊神经递质转运体 γ -氨基丁酸受体基因(*gamma-aminobutyric acid receptor gene, gat*)为靶点, 构建 shRNA 微藻(*Microalgae*)表达载体, 通过电击法将其转入莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*) CC124 和小球藻(*Chlorella vulgaris*) HOC5 中, 获得重组微藻, 并用其饲喂伊蚊幼虫和成蚊。【结果】*gat*-shRNA 转基因藻株可显著延缓伊蚊幼虫的发育、对伊蚊幼虫和成蚊表现出明显的致死效果, 致死率分别为 75.56% 和 58.67%。伊蚊幼虫体内目标基因 *gat* 的表达量显著降低。【结论】在封闭水域中投放 *gat*-shRNA 转基因微藻以抑制水域附近的蚊子种群是可行的。该策略为使用生物方法控制伊蚊, 以及阻断登革热、寨卡病毒病等严重传染病的传播提供了一种新的思路。

关键词: 莱茵衣藻; 小球藻; 登革热; 伊蚊; *gat* 基因

资助项目: 海南省重点研发计划(ZDYF2022SHFZ314); 国家自然科学基金(82260669); 海南省自然科学基金(322RC766); 农业农村部财政专项(NFZX2024)

This work was supported by the Key Research and Development Program of Hainan Province (ZDYF2022SHFZ314), the National Natural Science Foundation of China (82260669), the Natural Science Foundation of Hainan Province (322RC766), and the Financial Special Project of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs (NFZX2024).

*Corresponding authors. E-mail: XUE Chunmei, jmsxcm@126.com; FEI Xiaowen, xiaowen.fei@qq.com

Received: 2024-12-04; Accepted: 2024-12-31; Published online: 2025-02-25

Recombinant expression of shRNA targeting *gat* in microalgae for controlling *Aedes albopictus*

TANG Xinxin¹, DENG Xiaodong^{2,4}, HUANG Xiaodan³, YANG Siqu¹, XUE Chunmei^{1*}, FEI Xiaowen^{3*}

1 College of Biology and Agriculture, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang, China

2 Hainan Provincial Key Laboratory for Functional Components Research and Utilization of Marine Bioresources in Hainan Province, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan, China

3 School of Basic Medicine and Life Sciences, Hainan Medical University, Haikou, Hainan, China

4 Zhanjiang Experimental Station, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Zhanjiang, Guangdong, China

Abstract: [Objective] To explore the technical feasibility of using transgenic microalgae to control *Aedes* that transmit diseases such as dengue fever. **[Methods]** Taking the neurotransmitter transporter gamma-aminobutyric acid receptor gene (*gat*) of *Aedes* as a target, we constructed a shRNA-expressing vector and then transferred the vector into *Chlamydomonas reinhardtii* CC124 and *Chlorella vulgaris* HOC5 through electroporation. The recombinant microalgae were used to feed the larvae and adults of *Aedes albopictus*. **[Results]** The transgenic algae delayed the larval development and had obvious lethal effects on the larvae and adults of *A. albopictus*, causing the mortality rates of 75.56% and 58.67%, respectively. The expression level of *gat* in the larvae was significantly down-regulated. **[Conclusion]** Deploying *gat*-shRNA transgenic microalgae in enclosed water environments to suppress mosquito populations in the vicinity is technically feasible. This strategy provides a new perspective on using biological methods to control mosquitoes and block the transmission of severe infectious diseases such as dengue fever and Zika virus disease.

Keywords: *Chlamydomonas reinhardtii*; *Chlorella vulgaris*; dengue fever; *Aedes*; *gat*

登革热(dengue fever, DF)是一种由蚊子传播的疾病, 已经成为全球范围内一个非常紧急和重要的公共卫生问题。根据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)的统计数据(<https://www.who.int/zh/emergencies/disease-outbreak-news/item/2023-DON498>), 从2000年到2019年, 全球报告的登革热病例数量从50万增加到了520万, 这些病例分布在129个国家。2024年全球登革热疫情高发, 多国出现病例数上升。据WHO通报(<https://new.qq.com/rain/a/20240520A08ITS00>), 美洲地区2024年1-3月报告的登

革热病例数超过300万, 是2023年的3倍; 巴西发现的登革热疑似及确诊病例累计已超过427万例, 死亡病例达到2197例; 阿根廷登革热确诊病例为37.9万余例。1978年, 我国首次在广东省佛山市发现了登革热病例。至今, 我国在广东、广西、海南、云南、浙江、福建、台湾、澳门和香港等地区报告了登革热的暴发或流行以及本地感染病例^[1-3]; 据统计, 登革热病例高达655324例, 其中死亡病例为610例^[3]。登革热是一种通常症状轻微或无症状的疾病, 大多数患者会在1-2周内自愈。然而,

在极少数情况下,登革热可能会导致严重并发症,甚至死亡^[4]。登革热的典型症状包括高烧、剧烈头痛、眼球后疼痛、肌肉和关节痛、恶心、皮疹以及身体肿胀^[5]。这种疾病主要通过蚊子叮咬传播,涉及的蚊种包括白纹伊蚊(*Aedes albopictus*)和埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)。目前,尚无特定药物可以治疗登革热,因此预防和控制疾病的传播显得尤为重要。

目前,登革热的预防主要集中在消灭媒介蚊子上,采用的方法包括物理方法和化学方法。化学方法涉及使用不同类型的杀虫剂,如菊酯类杀虫剂、有机磷类杀虫剂以及四氟苯菊酯定量气雾剂^[6-8]。然而,化学杀虫剂的使用不仅会对环境造成污染,还可能对非目标物种造成伤害。此外随着时间的推移,蚊子可能会产生抗药性。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是自然界生物独有的一种特异性抵御外来病毒和微生物入侵的保护机制,同时也是一种基因调控机制,参与机体的生长、代谢和发育调控^[9]。RNAi 的作用实现依赖于双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA)的传递方法,从而使其开发过程更便捷^[10]。由于 RNAi 容易被无处不在的细菌酶降解,因此它不会对环境造成危害^[11-12]。如今, RNAi 技术已被应用于蚊虫控制领域。Mysore 等^[13]设计了酿酒酵母的 shRNA 结构,并将其制作成酵母片饲喂蚊子幼虫,吞食重组酵母的蚊子幼虫靶基因得到有效沉默,最终导致蚊虫死亡。蚊子幼虫生活在水中,以小球藻、微藻、细菌等为食。费小雯等^[14]针对蚊子的特性设计了 *V-ATPA* 基因的 RNAi 结构,并将其应用于莱茵衣藻中;通过使用重组微藻饲喂伊蚊幼虫,观察到幼虫的死亡率达到 100.0%,并且与对照组相比,相关基因的表达量下降了 97.4%。Carpenter 等^[15]通过 RNAi 技术成功使 *tor target of rapamycin (Tor)* 激酶基因的表达沉

默,结果导致了卵黄原蛋白表达量的降低,并直接抑制了雌蚊卵子的产生。由此可见, RNAi 技术在蚊虫防控方面的应用已经在理论和实验室层面取得了良好进展,为未来在实际环境中管理蚊虫种群提供了重要的指导意义。

γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)是一种重要的抑制性神经递质,它可以通过转运蛋白(GABA transporter, GAT)进入神经元或神经胶质细胞中。GAT 属于 Na^+/Cl^- 转运蛋白家族(SLC6 基因家族),在维持胞外 GABA 浓度稳定和突触间隙信号终止方面起着重要作用^[16-17]。据报道,对于昆虫而言, GABA 可以调节多种生理行为,如交配持久性^[18]、摄食限制^[19]、运动^[20]、睡眠^[21]、生物钟^[22]、对乙醇的反应^[23]和嗅觉记忆^[24]。GAT 在生理和病理状态下主要通过调控细胞外的 GABA 水平来发挥作用。当 *gat* 基因的表达出现异常时,会导致 GABA 介导的神经信号传递发生变化,这种变化会影响到 GABA 能神经元的活动,从而在维持神经系统的兴奋性与抑制性平衡中扮演核心角色。为此,本研究选择突触信号传递通路中的 *gat* 基因作为新的生物杀蚊靶点,将其转入莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*) CC124 和小球藻(*Chlorella vulgaris*) HOC5 中。将重组藻株饲喂白纹伊蚊幼虫和成虫后,重组藻株能在伊蚊体内释放针对 *gat* 基因的 shRNA,特异性地沉默伊蚊体内的 *gat* 基因,从而使其无法转运 GABA 蛋白,阻断伊蚊的正常生态发育并导致其死亡,这可为蚊媒传染病的防控提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

白纹伊蚊捕捉于中国热带农业科学院院内,由本实验室继代保存。莱茵衣藻 CC124 购自中国科学院淡水藻种库(<https://algae.ihb.ac.cn/>);小

球藻 HOC5 为海南本地物种, 分离纯化后接于 Tris-acetate-phosphate (TAP) 固体培养基保存。柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒购自 Omega 公司; 植物 DNA 提取试剂盒、RNA 提取试剂盒均购自广州美基生物科技有限公司; 潮霉素 B 购自北京索莱宝科技有限公司; 反转录试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司; AceQ[®] qPCR SYBR Green Master Mix (Low ROX Premixed) 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 限制性内切酶 *Bgl* II、*Sph* I、*Bst*E II 均购自宝生物工程(大连)有限公司。pCAMBIA1302 载体由深圳华大基因科技有限公司惠赠。

1.2 白纹伊蚊 *gat* 基因 shRNA 靶位点选择与设计

根据 NCBI 上已公布的伊蚊 *gat* 基因的 mRNA 序列(GenBank 登录号为 XM_019696122), 通过线上设计网站 GPP (<http://www.broadinstitute.org/rnai/public/seq/search>) 筛选出分数最高的几条 shRNA 靶序列, 并进行 BLAST 比对, 排除与其他非相关基因同源的序列后, 选择合适的作为靶序列。shRNA 模板中选用 CTCGAG 序列作为

中间 loop 环结构。根据 pCAMBIA1302 载体的酶切位点要求, 在正义链的 5' 端添加 GATC, 可与 *Bgl* II 酶切 pCAMBIA1302 载体后的黏性末端互补; 在反义链的 5' 端添加 GTCACC, 可与 *Bst*E II 酶切 pCAMBIA1302 载体后的黏性末端互补。设计好的 shRNA 序列包含酶切位点、正义链、loop 环、反义链、终止信号和酶切位点, 其序列见表 1。

1.3 shRNA RNAi 表达载体构建及鉴定

1.3.1 目的单链片段退火成双链

将设计合成的正、反向寡核苷酸单链 (100 μmol/L) 各 1 μL 加入 48 μL 的 10×H buffer (稀释 10 倍) 反应体系中(引物终浓度 2 μmol/L), 从 95 °C 缓慢退火至室温, 形成两端分别具有 *Bgl* II 和 *Bst*E II 黏性末端的寡核苷酸双链。

1.3.2 pCMBIA1302 载体的限制性酶切

先后使用 *Bgl* II 和 *Bst*E II 限制酶对 pCAMBIA1302 载体进行双酶切, 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定并用柱式 DNA 胶回收试剂盒回收。

表1 shRNA序列、扩增靶基因及内参引物的设计

Table 1 Design of shRNA sequences, target gene amplification and internal reference primers

Primers name	Primer sequences (5'→3')	Initial position
<i>Gat</i> target sequence	CGTGTGCTTCATCAGTTATTT	325
<i>Gat</i> -shRNA-F	GATCCGCGTGTGCTTCATCAGTTATTTCTCGAGAAATAA CTGATGAAGCACACGTTTTTG	
<i>Gat</i> -shRNA-R	GTCACCAAAAACGTGTGCTTCATCAGTTATTTCTCG AGAAATAACTGATGAAGCACACG	
<i>Gat</i> transcripts	GATCCGCGTGTGCTTCATCAGTTATTTCTCGAGAAA TAACTGATGAAGCACACG	
pCAMBIA1302-F	TTACCCAACCTTAATCGCCTTGCGAG	
pCAMBIA1302-R	TATCGCAATGATGGCATTGTAGG	
<i>Gat</i> -F	TGCCTTGTTCCCGTACTTCC	
<i>Gat</i> -R	GCGTTACGGCATCAATCCAC	
<i>PRS17</i> -F	AAGAAGTGGCCATCATTC	
<i>PRS17</i> -R	GGTCTCCGGGTCGACTTC	

1.3.3 连接与转化

将酶切后回收的载体与退火产物在 16 °C 下连接过夜(T4 DNA 连接酶)。连接产物转入 TOP10 感受态细菌中, 并涂布于含有卡那霉素(100 µg/mL)的 LB 平板上, 37 °C 恒温培养过夜(12–16 h)。第 2 天, 挑取阳性单菌落于 50 mL 含有卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 培养 10–12 h, 提取质粒, 并用 *Sph* I 酶切鉴定重组质粒。未连接干扰片段的空载体 pCAMBIA1302 质粒作为对照。将构建好的重组质粒命名为 *gat*-p1302。

1.4 shRNA RNAi 重组微藻的转化、筛选与鉴定

1.4.1 电击法转化莱茵衣藻、小球藻

采用 Wang 等^[25]的实验参数, 对电击条件进行调整。调整后的条件: 电压 500 V; 脉冲长度 4 MS; 脉冲次数 7 次; 间隔时间 100 ms。

1.4.2 筛选后阳性藻株的 DNA 提取及 PCR 鉴定

使用植物 DNA 提取试剂盒提取工程藻株的 DNA, 并进行 PCR 反应。引物序列见表 1 中的 pCAMBIA1302 引物。PCR 反应体系(25 µL): 2×Flash PCR MasterMix 12.5 µL, 上、下游引物(10 µmol/L)各 1 µL, DNA 模板 1 µL, ddH₂O 9.5 µL。PCR 反应条件: 98 °C 预变性 30 s; 94 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 15 s, 共 35 个循环; 72 °C 终延伸 1 min。通过 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 *gat*-p1302 表达载体是否成功转入微藻中。

1.4.3 伊蚊的饲养

蚊虫的繁育条件: 温度 27–29 °C, 强光照射, 添加饲料, 直至成蚊羽化。成蚊生长条件: 温度 27 °C, 相对湿度 70%, 使用 10% 蔗糖溶液饲喂成蚊, 每 48 h 提供 1 次小白鼠供雌蚊吸血。

1.4.4 伊蚊幼虫的生物学检测

将阳性工程藻株用于饲喂伊蚊幼虫, 每组 30 只幼虫, 重复 3 次。阳性工程藻饲喂伊蚊幼虫 4 d 后, 每组随机选取 5 只幼虫测量体长。

饲喂不同转基因藻株 4 d 后, 使用 RNA 提取试剂盒提取伊蚊幼虫总 RNA, 使用反转录试剂盒进行反转录, 得到 cDNA 后, 以白纹伊蚊体内核糖体蛋白 S17 (ribosomal protein S17, Gene ID: 109416926)作为内参基因进行 qPCR 检测。引物序列见表 1。qPCR 反应体系(20 µL): 2×AceQ[®] qPCR SYBR Green Master Mix 10 µL, 上、下游引物(10 µmol/L)各 0.4 µL, cDNA 模板 1 µL, ddH₂O 8.2 µL。反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 共 40 个循环; 95 °C 15 s, 60 °C 60 s; 95 °C 15 s。

1.4.5 糖毒诱饵试验

野生型 CC124 藻株与 10% 蔗糖溶液混合作为阴性对照; 0.1 mg/L 溴氰菊酯与 10% 蔗糖溶液混合作为阳性对照; 重组藻株与 10% 蔗糖溶液混合作为实验组。上述溶液按 1:1 比例混合后用于饲喂伊蚊成蚊。每组 50 只成蚊, 重复 3 次, 实验为期 7 d, 每天统计蚊虫死亡情况。

2 结果与分析

2.1 shRNA RNAi 表达载体的验证

使用限制性内切酶 *Sph* I 对构建好的 p1302-*gat* 重组质粒进行单酶切, 以未连接干扰片段的空载体 pCAMBIA1302 质粒作为对照。如图 1B 所示, pCAMBIA1302 空载质粒大小为 10 549 bp, 经 *Sph* I 酶切后得到 2 条片段, 大片段大小为 8 619 bp, 小片段为 1 930 bp, 重组质粒酶切后, 大片段大小为 8 619 bp, 小片段为 1 234 bp, 与预期结果一致, 说明载体构建成功。

2.2 阳性 shRNA RNAi 重组微藻的获得

将准备好的质粒与生长至对数期的 CC124

和 HOC5 分别进行电击转化。分别以 ddH₂O 组转化 CC124 和 HOC5 作为阴性对照, 以空载体 pCAMBIA1302 转化微藻作为阳性对照。电击转化后, 将藻株涂布在含有 25 $\mu\text{g/mL}$ 和 150 $\mu\text{g/mL}$ 潮霉素 B 的 TAP 固体培养基上, 筛选阳性工程藻株。将筛选后的单个藻株挑入 50 mL TAP 液体培养基中培养至对数期(*OD* 值为 0.3–0.5), 提取微藻基因组 DNA 进行 PCR 鉴定。2% 琼脂糖凝胶电泳部分结果见图 1C, 阳性藻株扩增的目的片段大小约为 475 bp。结果显示, 成功获得转 *gat*-shRNA 小球藻 5 株、转 *gat*-shRNA 莱茵衣藻 6 株, 以及转空载体 pCAMBIA1302 的转基因藻

株 5 株。

2.3 饲喂 shRNA 重组微藻对伊蚊幼虫进行 RNA 干扰

2.3.1 饲喂 shRNA 重组微藻对伊蚊幼虫的影响

为了探究 *gat* 基因沉默对伊蚊幼虫的致死效果, 将成功转化的 RNAi 重组微藻用于饲喂伊蚊幼虫, 设置 2 组实验。第 1 组: 对照组(饲料组、CC124 组、pCAMBIA1302 组)和实验组(转莱茵衣藻 *gat* 1–5 号转化子); 第 2 组: 对照组(饲料组、HOC5 组、pCAMBIA1302 组)和实验组(转小球藻 *gat* 1–5 号转化子), 每组重复 3 次。观察

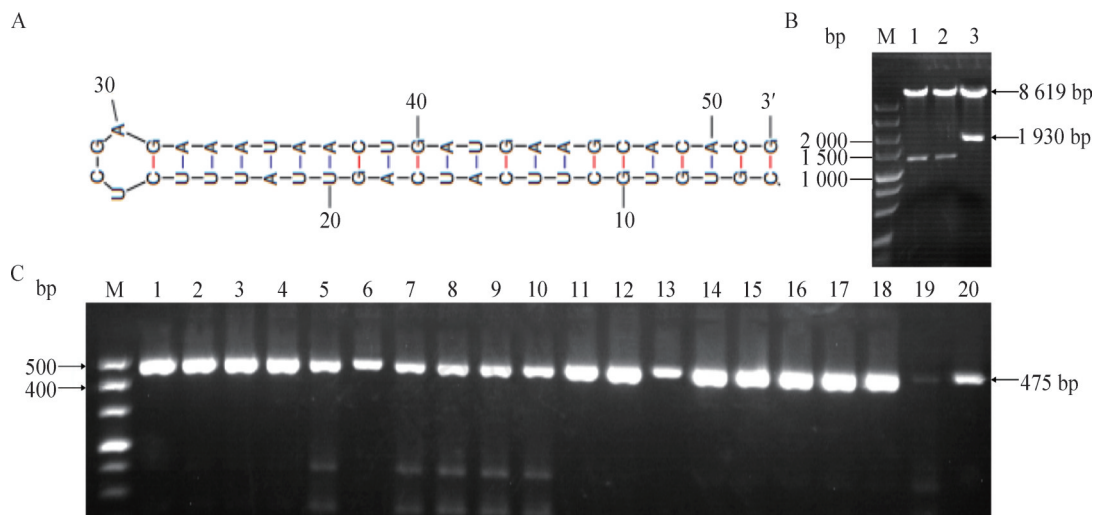


图1 琼脂糖凝胶电泳图。A: *gat*-shRNA二级结构预测图; B: *gat*-p1302鉴定结果图(Lane M: DL5000 DNA marker; Lanes 1–2: *gat*-p1302; Lane 3: pCAMBIA1302质粒); C: 转基因藻鉴定结果图(Lane M: DL500 DNA marker; Lanes 1–5: *gat*-shRNA小球藻转化子1–5; Lanes 7–12: *gat*-shRNA莱茵衣藻转化子1–5; Lanes 14–15: 转空载体 pCAMBIA1302 的莱茵衣藻转化子1–2; Lanes 16–18: 转空载体 pCAMBIA1302 的小球藻转化子1–2; Lanes 6、13: p1302-*gat*质粒; Lane 19: CC124 DNA; Lane 20: pCAMBIA1302质粒)。

Figure 1 Agarose gel electrophoresis. A: *gat*-shRNA secondary structure prediction diagram; B: Identification result of *gat*-p1302 (Lane M: DL5000 DNA marker; Lanes 1–2: *gat*-p1302; Lane 3: pCAMBIA1302 plasmid); C: Transgenic algae identification result diagram (Lane M: DL500 DNA marker; Lanes 1–5: Transformants 1–5 of *gat*-shRNA *Chlorella*; Lanes 7–12: Transformants 1–5 of *gat*-shRNA *C. reinhardtii*; Lanes 14–15: Transformants 1–2 of *C. reinhardtii* with the empty vector pCAMBIA1302; Lanes 16–18: Transformants 1–2 of *Chlorella* with the empty vector pCAMBIA1302; Lanes 6 and 13: p1302-*gat* plasmid; Lane 19: CC124 DNA; Lane 20: pCAMBIA1302 plasmid).

发现, 饲喂重组莱茵衣藻和小球藻的伊蚊幼虫生长发育迟缓, 身体出现轻微颤抖, 对光照反应迟钝。幼虫死亡率见图 2, 饲喂重组 CC124 藻株的伊蚊幼虫在饲喂第 2 天开始出现死亡现象, 观察 15 d 后, 饲喂野生 CC124 藻株的幼虫死亡率为 27.78%, 饲喂空载体 p1302 藻株的幼虫死亡率为 30.00%, 而饲喂转莱茵衣藻 *gat* 基因的幼虫死亡率最高, 达到 75.56%; 饲喂重组 HOC5 藻株的伊蚊幼虫在第 1 天开始出现死亡, 第 2 天至第 10 天死亡速度较快, 第 10 天后死亡速度逐渐减缓, 饲喂野生 HOC5 藻株的幼虫死亡率为 0, 饲喂转空载体 p1302 藻株的幼虫死亡率为 2.22%, 而饲喂转小球藻 *gat* 基因的幼虫死亡率为 62.22%。通过 SPSS 软件(IBM SPSS Statistics 19)进行单因素方差分析, 结果显示在饲喂莱茵衣藻组中处理组 1-5 号转化子与对照组之间白纹伊蚊的死亡率差异显著($P<0.05$), 但各重组藻株转化子之间的差异性不显著($P>0.05$); 在饲喂小球藻组中, 处理组 1-5 号转化子与对照组之间白纹伊蚊的死亡差异显著

($P<0.05$), 但各重组藻株转化子之间死亡差异不显著($P>0.05$), 说明饲喂 *gat*-shRNA 重组莱茵衣藻和小球藻对伊蚊幼虫具有显著的致死效果。

2.3.2 饲喂 shRNA 重组微藻对伊蚊幼虫体长的影响

根据 2.3.1 节的结果, 重组微藻对伊蚊幼虫的生长发育有显著影响。因此, 设置 2 组实验, 饲喂伊蚊幼虫 4 d 后, 每组随机挑取 5 只幼虫, 在显微镜下测量其体长(图 3、图 4)。饲喂清水组、饲料组和野生 CC124 藻株组的幼虫平均体长分别为 1 888.40、5 865.00 和 3 974.20 μm ; 饲喂转莱茵衣藻 *gat* 1-5 转化子组的幼虫平均体长分别为 3 086.40、3 040.40、3 079.20、3 451.40 和 3 215.80 μm ; 饲喂野生小球藻藻株组的幼虫平均体长为 4 503.00 μm , 饲喂转小球藻 *gat* 1-5 转化子组的幼虫平均体长分别为 2 851.33、2 860.67、2 634.33、2 658.33 和 2 513.67 μm , 说明实验组幼虫的体长明显短于对照组($P<0.05$), 表明 *gat* 基因的沉默能够延缓伊蚊幼虫的发育。

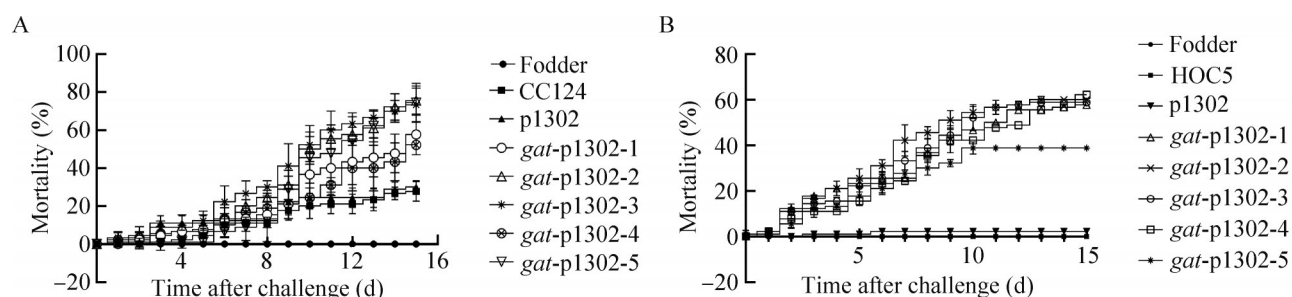


图2 饲喂重组微藻的伊蚊幼虫死亡率。A: 饲喂转莱茵衣藻*gat*-shRNA转化子1-5的幼虫死亡率(CC124: 野生莱茵衣藻饲喂幼虫); B: 饲喂转小球藻*gat*-shRNA转化子1-5的幼虫死亡率(HOC5: 野生小球藻饲喂幼虫)。Fodder: 用饲料饲喂幼虫; p1302: 转空载体pCAMBIA1302的小球藻饲喂幼虫; *gat*-p1302-1-*gat*-p1302-5: 转*gat*-shRNA小球藻饲喂幼虫。

Figure 2 Mortality rate of *Aedes aegypti* larvae fed with recombinant microalgae. A: Mortality rate of larvae fed with *gat*-shRNA transformed *C. reinhardtii* strains 1-5 (CC124: Larvae fed with wild-type *C. reinhardtii*); B: Mortality rate of larvae fed with *gat*-shRNA transformed *Chlorella* strains 1-5 (HOC5: Larvae fed with wild-type *Chlorella*). Fodder: Larvae fed with feed; p1302: Larvae fed with *Chlorella* transformed with the empty vector pCAMBIA1302; *gat*-p1302-1-*gat*-p1302-5: Larvae fed with *Chlorella* transformed with *gat*-shRNA.

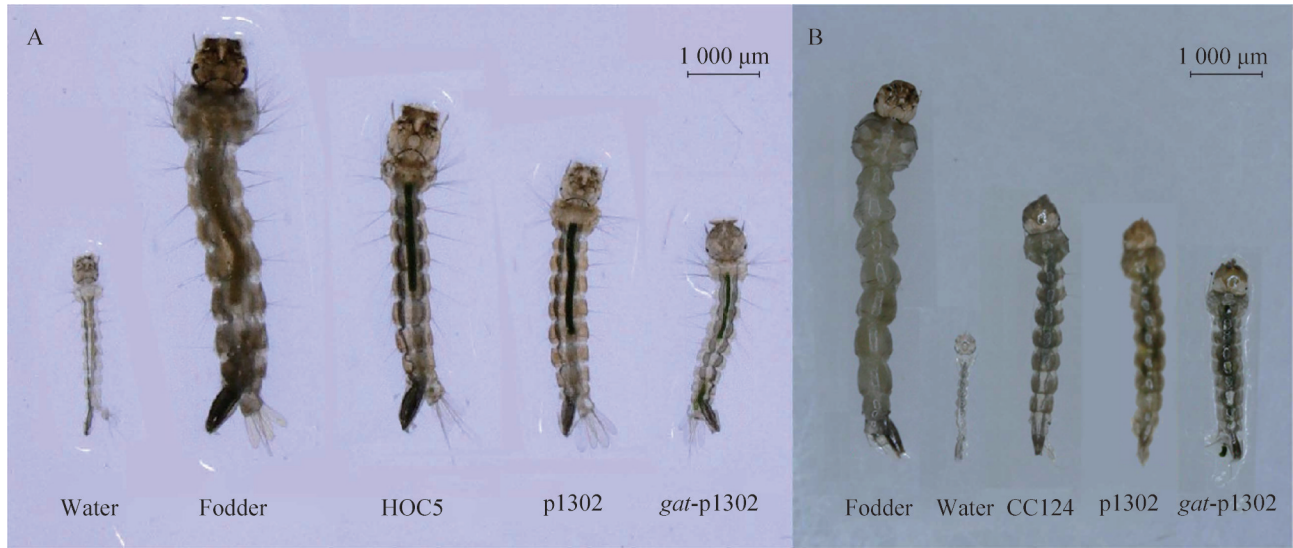


图3 显微镜下伊蚊幼虫的体长。A: 转基因小球藻饲喂伊蚊幼虫(HOC5: 野生小球藻饲喂幼虫); B: 转基因莱茵衣藻饲喂伊蚊幼虫(CC124: 野生莱茵衣藻饲喂幼虫)。Water: 用过滤水饲喂幼虫; Fodder: 用饲料饲喂幼虫; p1302: 转空载体pCAMBIA1302的莱茵衣藻饲喂幼虫; gat-p1302: 转gat-shRNA莱茵衣藻饲喂幼虫。

Figure 3 Length of *Aedes aegypti* larvae under the microscope. A: Larvae fed with transgenic *Chlorella* (HOC5: Larvae fed with wild-type *Chlorella*); B: Larvae fed with transgenic *C. reinhardtii* (CC124: Larvae fed with wild-type *C. reinhardtii*). Water: Larvae fed with filtered water; Fodder: Larvae fed with feed; p1302: Larvae fed with *C. reinhardtii* transformed with the empty vector pCAMBIA1302; gat-p1302: Larvae fed with *C. reinhardtii* transformed with *gat*-shRNA.

2.3.3 饲喂 shRNA 微藻对重组伊蚊幼虫靶基因表达的影响

为了检测伊蚊幼虫饲喂重组微藻是否有效沉默靶基因的表达, 选取饲喂第4天的幼虫通过 qPCR 技术检测靶基因表达水平。以饲喂野生 CC124 藻株、野生 HOC5 藻株和转空载体 pCAMBIA1302 的微藻为对照组, 以 RpS17 作为内参基因。测定结果见图 5, 饲喂 *gat*-shRNA 莱茵衣藻的幼虫靶基因相对表达量为 55.93%, 饲喂 *gat*-shRNA 小球藻的幼虫靶基因相对表达量为 20.46%, 而对照组的相对基因表达量为 100.00%。结果表明, 饲喂重组微藻的伊蚊幼虫靶基因表达显著下调, 说明该 RNAi 重组微藻能够有效沉默靶基因, 且处理组与对照组之间的

差异显著($P < 0.05$)。

2.4 饲喂 shRNA 重组微藻对伊蚊成虫致死情况

本研究分为 3 组: 野生 CC124 藻株+10% 蔗糖作为阴性对照; 溴氰菊酯+10% 蔗糖作为阳性对照; *gat*-shRNA 莱茵衣藻+10% 蔗糖作为实验组。成蚊落在蚊笼底端且无活动能力视为死亡。观察 7 d 的成蚊致死结果见图 6, 饲喂无毒野生莱茵衣藻 CC124 混合液的成蚊最终死亡率为 20.67%, 饲喂有毒的溴氰菊酯混合液的成蚊在第 5 天死亡率即达 100.00%, 而饲喂有毒的 *gat*-shRNA 莱茵衣藻混合液的成蚊死亡率为 58.67%。与无毒 CC124 组相比, 实验组对伊蚊成虫具有显著的致死效果。

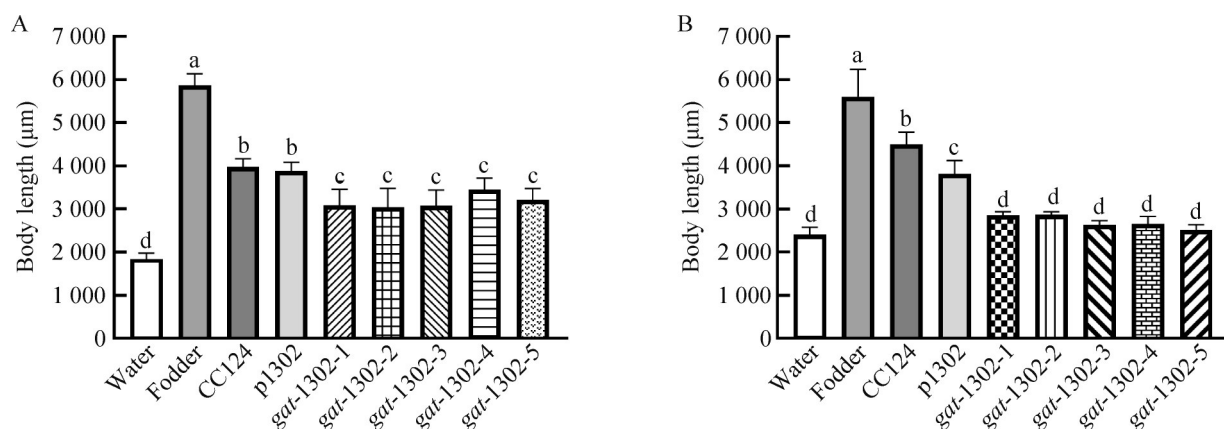


图4 饲喂不同食物后伊蚊幼虫的体长。A: 转 gat -shRNA莱茵衣藻转化子1–5喂饲幼虫体长; B: 转 gat -shRNA小球藻转化子1–5喂饲幼虫体长。Water: 用过滤水饲喂幼虫; Fodder: 用饲料饲喂幼虫; HOC5: 野生小球藻饲喂幼虫; p1302组: 转空载体pCAMBIA1302的小球藻饲喂幼虫; gat -p1302-1– gat -p1302-5: 转 gat -shRNA小球藻饲喂幼虫。不同小写字母表示显著差异($P<0.05$)。

Figure 4 Larval body length of *Aedes aegypti* after being fed different foods. A: Body length of larvae fed with gat -shRNA transformed *C. reinhardtii* strains 1–5; B: Body length of larvae fed with gat -shRNA transformed *Chlorella* strains 1–5. Water: Larvae fed with filtered water; Fodder: Larvae fed with feed; HOC5: Larvae fed with wild-type *Chlorella*; p1302: Larvae fed with *Chlorella* transformed with the empty vector pCAMBIA1302; gat -p1302-1– gat -p1302-5: Larvae fed with *Chlorella* transformed with gat -shRNA. Different small letters indicate significant difference ($P<0.05$).

3 讨论与结论

RNAi 技术通过降低特定基因的表达来控制昆虫种群, 为昆虫治理提供了一种新的方案^[26–27]。特别是在蚊子研究领域, RNAi 不仅被用来探究蚊子的基因功能, 还用于研究蚊子与病原体之间的相互作用^[28]。在运用 RNAi 技术进行蚊子防控方面, 目前主要采用的方法包括注射、浸泡、利用纳米颗粒以及通过微生物将双链 RNA (dsRNA) 传递给蚊子幼虫^[28–30]。例如, 费小雯等^[14]针对蚊子的特性设计了 *V-ATPA* 基因的 RNAi 结构, 并将此技术应用于莱茵衣藻中; 通过使用重组微藻饲喂伊蚊幼虫, 观察到幼虫的死亡率达到了 100%。此外, 费小雯等^[31]构建了针对埃及伊蚊 *3HKT* 基因的 RNAi 结构, 并将其转化到莱茵衣藻中, 用其饲喂蚊子幼虫, 结果表明, 这种方法对伊蚊幼虫也具有 100% 的致

死率。相比之下, 本研究中使用的转基因藻类对白纹伊蚊幼虫的致死率为 62.22%–75.56%。致死效果的差异可能源于目标物种的不同以及所选择的 RNAi 沉默片段的差异。利用微藻作为介导 RNA 干扰(RNAi)的技术, 可以高效地实现目标基因的敲除, 这种方法不仅成本低廉、环保, 而且不会增加蚊虫的抗药性。使用莱茵衣藻和小球藻作为外源 RNAi 的载体, 通过让幼虫和成虫摄取经过 RNAi 重组的微藻来实现靶基因的敲除。本研究合成的 RNAi 外源片段是小发夹 RNA (shRNA), 生成的小发夹 RNA 结构单一, 专一性更强, 且与 RNA 诱导沉默复合体的结合效率更高, 能有效降低脱靶效应。

Gat 基因编码的蛋白对神经递质的转运至关重要。通过饲喂幼虫和成虫 RNAi 重组微藻来研究 *gat* 基因在伊蚊中的功能, 结果显示, 当伊蚊

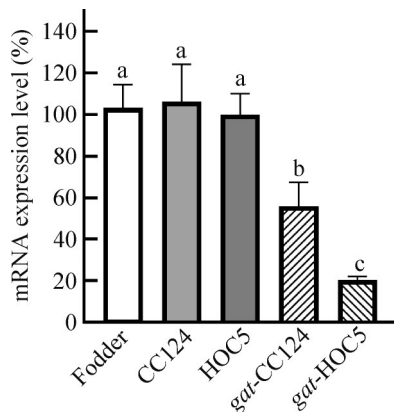


图5 饲喂shRNA重组微藻后伊蚊幼虫靶基因表达量。Fodder: 用饲料饲喂幼虫; CC124: 野生莱茵衣藻饲喂幼虫; HOC5: 野生小球藻饲喂幼虫; gat-CC124: gat-shRNA 莱茵衣藻饲喂幼虫; gat-HOC5: gat-shRNA小球藻饲喂幼虫。不同小写字母表示显著差异($P<0.05$)。

Figure 5 Target gene expression levels in *Aedes aegypti* larvae after being fed shRNA recombinant microalgae. Fodder: Larvae fed with feed; CC124: Larvae fed with wild-type *C. reinhardtii*; HOC5: Larvae fed with wild-type *Chlorella*; gat-CC124: Larvae fed with gat-shRNA *C. reinhardtii*; gat-HOC5: Larvae fed with gat-shRNA *Chlorella*. Different small letters indicate significant difference ($P<0.05$).

的 *gat* 基因受到干扰时, 与对照组相比伊蚊的死亡率显著增加(图 2), 幼虫的生长发育也受到抑制, 体长相对较短(图 3、图 4), 数据表明 *gat* 基因在伊蚊的生长发育中起到了关键作用。qPCR 分析进一步证实, 通过饲喂 RNAi 重组微藻可以显著降低靶基因的 mRNA 水平, 从而成功地对 *gat* 基因进行了 RNA 干扰(图 5)。糖毒诱饵实验是一种相对较新发展的诱捕技术, 具有高特异性、可持续和低成本等特点^[32-33]。在糖毒诱饵实验中引入重组微藻 gat-shRNA 后, 24 h 观察到显著的致死效果, 表明在幼虫期间储备的能量已基本耗尽, 成蚊渴望寻找更多食物来维持生存。尽管阴性对照组也有死亡, 但处理组的

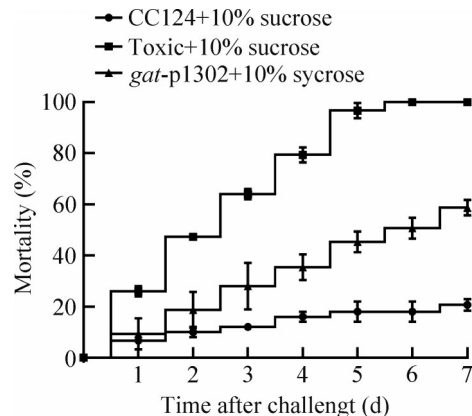


图6 转基因微藻对成蚊的致死率。CC124+10% sucrose: 野生 CC124 藻株和 10% 蔗糖的混合液; Toxic+10% sucrose: 0.1 mg/L 溴氰菊酯和 10% 蔗糖的混合液; gat-p1302+10% sucrose: gat-shRNA 莱茵衣藻和 10% 蔗糖的混合液。

Figure 6 Lethal rate of transgenic microalgae on adult mosquitoes. CC124+10% sucrose: A mixture of wild-type CC124 and 10% sucrose; Toxic+10% sucrose: Mixture of 0.1 mg/L deltamethrin and 10% sucrose; gat-p1302+10% sucrose: gat-shRNA mixture of *C. reinhardtii* and 10% sucrose.

死亡率为 58.67%, 高于阴性对照(图 6), 而阳性对照组的死亡率为 100.00%。虽然处理组的死亡率略低于溴氰菊酯阳性糖毒诱饵的致死率, 但使用重组微藻比使用溴氰菊酯杀虫剂更安全、更环保。

综上所述, 使用 *gat* RNAi 重组微藻对蚊子进行处理显示出了明显的杀虫效果。由于微藻可以作为伊蚊幼虫的食物, 并且在自然界中广泛存在, 因此 *gat* RNAi 重组微藻在商业应用方面具有巨大潜力。然而, 白纹伊蚊的生理过程极为复杂, 目前的研究仅局限于 mRNA 表达水平的变化, 对于蛋白质层面的影响尚未深入探讨。因此, 未来的研究需要进一步扩展至蛋白质层面, 以全面理解 *gat* 基因干扰的作用机制。同时, 基于微藻 RNAi 的技术为蚊虫种群控制提供了新的途径。

作者贡献声明

唐欣欣：实验实施，结果分析，论文写作与修改；邓晓东：实验构思及设计，技术支持；黄小丹：实验实施；杨思琪：论文讨论及数据整理；薛春梅：论文讨论及修改；费小雯：实验构思及设计。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] 王福春. 我国登革热流行概况与预防控制措施研究进展[J]. 职业与健康, 2018, 34(12): 1717-1721.
WANG FC. Epidemic situation and prevention and control measures of dengue fever in China[J]. *Occupation and Health*, 2018, 34(12): 1717-1721 (in Chinese).
- [2] 岳玉娟, 任东升, 刘起勇. 2005-2013年中国大陆登革热疫情时空分布[J]. 疾病监测, 2015, 30(7): 555-560.
YUE YJ, REN DS, LIU QY. Spatial-temporal distribution of dengue fever in the mainland of China, 2005-2013[J]. *Disease Surveillance*, 2015, 30(7): 555-560 (in Chinese).
- [3] WU JY, LUN ZR, JAMES AA, CHEN XG. Dengue fever in the mainland of China[J]. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2010, 83(3): 664-671.
- [4] UNDURRAGA EA, EDILLO FE, ERASMO JNV, ALERA MTP, YOON IK, LARGO FM, SHEPARD DS. Disease burden of dengue in the Philippines: adjusting for underreporting by comparing active and passive dengue surveillance in Punta Princesa, Cebu City[J]. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2017, 96(4): 887-898.
- [5] 戴安, 舒云, 刘平华, 左吉玲, 李素梅, 李婷婷. 登革热流行现状及诊疗进展[J]. 现代临床医学, 2022, 48(1): 69-72.
DAI A, SHU Y, LIU PH, ZUO JL, LI SM, LI TT. Journal of Modern Clinical Medicine, 2022, 48(1): 69-72 (in Chinese).
- [6] MATSUO N, SUGISAKA Y, AOYAMA S, IHARA M, SHINOYAMA H, HOSOKAWA M, KAMAKURA Y, TANAKA D, TANABE Y, MATSUDA K. Creating pyrethrin mimetic phosphonates as chemical genetics tools targeting the GDSL esterase/lipase TcGLIP to investigate pyrethrin biosynthesis[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2023, 66(12): 7959-7968.
- [7] JIMÉNEZ-JIMÉNEZ S, CASADO N, GARCÍA MÁ, MARINA ML. Enantiomeric analysis of pyrethroids and organophosphorus insecticides[J]. *Journal of Chromatography A*, 2019, 1605: 360345.
- [8] 杨维芳, 褚宏亮, 徐燕, 陈红娜, 刘大鹏, 刘慧. 3.9%四氟苯菊酯定量气雾剂的杀蚊效果[J]. 中华卫生杀虫药械, 2021, 27(5): 477-479.
YANG WF, CHU HL, XU Y, CHEN HN, LIU DP, LIU H. Control effect of 3.9% transfluthrin quantitative insecticidal aerosol against mosquitoes[J]. *Chinese Journal of Hygienic Insecticides & Equipments*, 2021, 27(5): 477-479 (in Chinese).
- [9] ZONG D, GAN PH, ZHOU AP, LI JY, XIE ZL, DUAN AN, HE CZ. Comparative analysis of the complete chloroplast genomes of seven *Populus* species: insights into alternative female parents of *Populus tomentosa*[J]. *PLoS One*, 2019, 14(6): e0218455.
- [10] ATTARDO GM, HIGGS S, KLINGLER KA, VANLANDINGHAM DL, RAIKHEL AS. RNA interference-mediated knockdown of a GATA factor reveals a link to anautogeny in the mosquito *Aedes aegypti*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(23): 13374-13379.
- [11] ZHU JS, CHEN L, RAIKHEL AS. Posttranscriptional control of the competence factor β FTZ-F1 by juvenile hormone in the mosquito *Aedes aegypti*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(23): 13338-13343.
- [12] WANG SF, CAO ZC, LI MY, YUE YT. G-DipC: an improved feature representation method for short sequences to predict the type of cargo in cell-penetrating peptides[J]. *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics*, 2020, 17(3): 739-747.
- [13] MYSORE K, HAPAIRAI LK, WEI N, REALEY JS, SCHEEL ND, SEVERSON DW, DUMAN-SCHEEL M. Preparation and use of a yeast shRNA delivery system for gene silencing in mosquito larvae[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2019, 1858: 213-231.
- [14] 费小雯, 肖洒, 贺长皓, 李亚军, 黄晓晴, 李江月, 邓晓东. 伊蚊 V-ATPA 基因 RNAi 干涉载体构建及其转基因衣藻对伊蚊致死作用[J]. 基因组学与应用生物学, 2021, 40(5): 1961-1969.
FEI XW, XIAO S, HE CH, LI YJ, HUANG XQ, LI JY, DENG XD. Construction of RNAi interference vector of *Aedes aegypti* V-ATPA gene and lethal effect of transgenic *Chlamydomonas aegypti*[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2021, 40(5): 1961-1969 (in Chinese).
- [15] CARPENTER VK, DRAKE LL, AGUIRRE SE, PRICE DP, RODRIGUEZ SD, HANSEN IA. SLC7 amino acid transporters of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* and their role in fat body TOR signaling and reproduction[J]. *Journal of Insect Physiology*, 2012, 58(4): 513-522.
- [16] MCCOOLE MD, D'ANDREA BT, BAER KN, CHRISTIE AE. Genomic analyses of gas (nitric oxide and carbon monoxide) and small molecule transmitter (acetylcholine, glutamate and GABA) signaling systems in *Daphnia pulex*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics & Proteomics*, 2012, 7(2): 124-160.
- [17] XU G, WU SF, WU YS, GU GX, FANG Q, YE GY. *De novo* assembly and characterization of central nervous system transcriptome reveals neurotransmitter signaling systems in the rice striped stem borer, *Chilo suppressalis*[J]. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 525.
- [18] CRICKMORE MA, VOSSHALL LB. Opposing dopaminergic and GABAergic neurons control the duration and

- persistence of copulation in *Drosophila*[J]. Cell, 2013, 155(4): 881-893.
- [19] POOL AH, KVELLO P, MANN K, CHEUNG SK, GORDON MD, WANG LM, SCOTT K. Four GABAergic interneurons impose feeding restraint in *Drosophila*[J]. Neuron, 2014, 83(1): 164-177.
- [20] DIMITRIJEVIC N, DZITOYEVA S, SATTA R, IMBESI M, YILDIZ S, MANEV H. *Drosophila* GABAB receptors are involved in behavioral effects of γ -hydroxybutyric acid (GHB)[J]. European Journal of Pharmacology, 2005, 519(3): 246-252.
- [21] AGOSTO J, CHOI JC, PARISKY KM, STILWELL G, ROSBASH M, GRIFFITH LC. Modulation of GABAA receptor desensitization uncouples sleep onset and maintenance in *Drosophila*[J]. Nature Neuroscience, 2008, 11(3): 354-359.
- [22] HAMASAKA Y, WEGENER C, NÄSSEL DR. GABA modulates *Drosophila* circadian clock neurons via GABAB receptors and decreases in calcium[J]. Journal of Neurobiology, 2005, 65(3): 225-240.
- [23] DZITOYEVA S, DIMITRIJEVIC N, MANEV H. Gamma-aminobutyric acid B receptor 1 mediates behavior-impairing actions of alcohol in *Drosophila*: adult RNA interference and pharmacological evidence[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(9): 5485-5490.
- [24] BOUMGHAR K, COURET-FAUVEL T, GARCIA M, ARMENGAUD C. Evidence for a role of GABA- and glutamate-gated chloride channels in olfactory memory[J]. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 2012, 103(1): 69-75.
- [25] WANG L, YANG LJ, WEN X, CHEN ZY, LIANG QY, LI JL, WANG W. Rapid and high efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by square-wave electroporation[J]. Bioscience Reports, 2019, 39(1): BSR20181210.
- [26] BAUM JA, BOGAERT T, CLINTON W, HECK GR, FELDMANN P, ILAGAN O, JOHNSON S, PLAETINCK G, MUNYIKWA T, PLEAU M, VAUGHN T, ROBERTS J. Control of coleopteran insect pests through RNA interference[J]. Nature Biotechnology, 2007, 25(11): 1322-1326.
- [27] MAO YB, CAI WJ, WANG JW, HONG GJ, TAO XY, WANG LJ, HUANG YP, CHEN XY. Silencing a cotton bollworm *P450* monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol[J]. Nature Biotechnology, 2007, 25(11): 1307-1313.
- [28] AIRS PM, BARTHOLOMAY LC. RNA interference for mosquito and mosquito-borne disease control[J]. Insects, 2017, 8(1): 4.
- [29] BALAKRISHNA PILLAI A, NAGARAJAN U, MITRA A, KRISHNAN U, RAJENDRAN S, HOTI SL, MISHRA RK. RNA interference in mosquito: understanding immune responses, double-stranded RNA delivery systems and potential applications in vector control[J]. Insect Molecular Biology, 2017, 26(2): 127-139.
- [30] WHITTEN MM. Novel RNAi delivery systems in the control of medical and veterinary pests[J]. Current Opinion in Insect Science, 2019, 34: 1-6.
- [31] 费小雯, 张阳, 李亚军, 邓晓东. 伊蚊 3HKT 基因 RNAi 载体构建及口服对伊蚊的致死作用[J]. 热带生物学报, 2021, 12(3): 356-362.
- FEI XW, ZHANG Y, LI YJ, DENG XD. Construction of RNAi vector of *3HKT* gene and its lethal effect on *Aedes aegypti*[J]. Journal of Tropical Biology, 2021, 12(3): 356-362 (in Chinese).
- [32] REVAY EE, MÜLLER GC, QUALLS WA, KLINE DL, NARANJO DP, ARHEART KL, KRAVCHENKO VD, YEFREMOVA Z, HAUSMANN A, BEIER JC, SCHLEIN Y, XUE RD. Control of *Aedes albopictus* with attractive toxic sugar baits (ATSB) and potential impact on non-target organisms in St. Augustine, Florida[J]. Parasitology Research, 2014, 113(1): 73-79.
- [33] FIORENZANO JM, KOEHLER PG, XUE RD. Attractive toxic sugar bait (ATSB) for control of mosquitoes and its impact on non-target organisms: a review[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2017, 14(4): 398.