

## 重组 DNA 技术和病毒杀虫剂

### Recombination DNA and Viral Insecticides

冯启理\*

(加拿大资源部林业厅大湖林业中心)

大量使用化学杀虫剂等农药,对生态环境和人类健康所造成的影响已越来越严重。因此,寻找更有效安全和对环境影响较少的生物杀虫剂已变得越来越迫切了。病毒杀虫剂是化学杀虫剂的有效替代方法,有着广阔的应用前景。

在自然界,昆虫群体本身就存在各种各样的病毒,这些病毒在一定程度上控制着昆虫群体的数量,是昆虫的天敌。很早以前人们就开始利用野生型昆虫病毒作为昆虫杀虫剂。病毒杀虫剂较之化学杀虫剂的优点包括:对环境污染少,不会长期残留在田间;宿主专一,大多数杆状病毒仅感染同一科内的少数种昆虫而不感染其他昆虫和生物,这就使得病毒杀虫剂在害虫的综合防治上很有优势,即在杀灭目标害虫的同时,不会杀灭生态系统中的其他生物;低宿主抗性,昆虫一般对专一病毒的抗性是很低的,长期施用亦不会导致昆虫产生抗药性;生产相对简单,不需要很复杂的设备,不象化学杀虫剂生产工厂排放大量污染环境的化合物。因此,病毒杀虫剂较之化学杀虫剂来说,对生态环境的影响少得多,更适合于未来可持续发展农业的要求。

但野生型病毒杀虫剂也有其缺点。野生型病毒杀灭害虫的速度较慢,通常需要几天到几周的时间才能杀死害虫,而在这段时间昆虫仍在进食。另外,寄主范围也很窄。这些因素使得野生型病毒杀虫剂很难与化学杀虫剂在市场上竞争,因而限制了工商界对病毒杀虫剂的应用开发的兴趣和投资。然而,自90年代开始,由于分子生物学尤其是重组DNA技术的发展,这方面的状况已经有了很大的改变。重组DNA技术在发展重组病毒杀虫剂方面提供了极其有效的手段。野生型病毒杀虫剂的缺点可以通过重组DNA技术加以克服,除了加快野生型病毒杀灭害虫的速度外,还可以增加病毒的产量,改变宿主范围使之适合杀灭更多的害虫,因而使得病毒杀虫剂在害虫的综合治理方面起到越来越重要的作用,亦极大地增强了病毒杀

虫剂的市场竞争力。

尽管有1200多种昆虫病毒有可能用作病毒杀虫剂,但目前最适用于病毒杀虫剂的昆虫病毒主要是杆状病毒。杆状病毒科主要有核型多角体病毒和颗粒病毒两个属。作为害虫防治的重组病毒的研究开发主要集中在专一感染鳞翅目昆虫的核型多角体病毒。其中苜蓿造桥虫核型多角体病毒(AcMNPV)和家蚕核型多角体病毒(BmMNPV)是最主要的两种用于重组病毒开发的杆状病毒。原因之一是它们基因组DNA的顺序分析已全部完成。

在发展重组型病毒方面,重组DNA技术主要包括除去野生型病毒基因组的某些基因;或向野生型病毒基因组中导入外源基因;或通过突变技术改变野生型病毒的遗传结构等。理论上,任何一个基因,如果其产物能引起害虫不正常的发育和行为以及减少昆虫进食量的都可以用于重组到病毒基因组中,达到加快害虫死亡和减少害虫造成的生物产量损失的目的。一般来说,理想的基因应该是其产物能作用于整个昆虫的所有组织细胞而不应仅仅作用于受感染的个别细胞。目前已用于重组病毒杀虫剂的基因包括。

①昆虫毒素,例如,从蝎子提取的BeIT毒素、LqhIT2毒素和AaIT毒素。这些毒素作用于昆虫神经元上,引起突触前兴奋,受重组病毒感染的昆虫表现出过敏反应和停止进食。与野生型病毒相比,这些基因的重组病毒通常可使致死时间缩短25%~40%左右,而进食量减少30%~50%左右;从细菌中提取的Bt内毒素,可引起昆虫中肠细胞膜穿孔,导致细胞渗透压平衡改变;从螨虫体中提取的Txpl毒素,可以引起昆虫肌肉收缩和麻醉,不能行动,进食迅速被抑制。这些毒素蛋白的基因已经被克隆到不同的病毒基因组中,产生有效地杀灭害虫的重组病毒,不同程度地减少了杀灭害虫所需要的时间。

②一些昆虫激素的基因也用于构建重组病毒。例如,从烟草天蛾幼虫中分离出来的利尿素、孵化素以

\* 研究员

及从家蚕体中分离的前胸腺向性激素,已经在 AcMNPV 中表达。通过超量表达这些昆虫激素,使体内激素的平衡状态受到破坏,因而使其代谢絮乱,最终死亡。这些重组病毒都不同程度地加快了病毒的杀虫速度,提高了杀虫效果。

③蛋白酶的基因也用于重组病毒。例如,从野生型病毒基因组中除去脱皮激素 UDP 葡糖基转移酶的基因。由于这种酶阻滞了病毒宿主幼虫的脱皮,使幼虫一直处于一种进食状态,所以带有这个基因的野生型病毒往往在杀死害虫之前,反而引致昆虫增大食量,造成植物更多的损失。从野生型病毒中除掉这个基因,减少了病毒对害虫脱皮的抑制,从而减少害虫的进食量。保幼激素酯酶基因是另一种可用于构建重组病毒的昆虫基因。保幼激素是重要的昆虫激素,它与脱皮激素一起控制着幼虫的发育方向。保幼激素酯酶催化稳定和具生物活性的保幼激素转变成无活性的保幼激素酸,从而降低体内具生物活性的保幼激素水平。这个基因大量表达的结果,使得昆虫体内保幼激素水平下降,昆虫提前脱皮进入蛹期,这样减少了幼虫的进食量。这个酶的基因已经被克隆到 AcMNPV 的基因组中,大大加快了害虫死亡和减少了害虫对烟草和棉花等植物的侵袭。

④一些蛋白调节因子,尤其是细胞核内调节因子的基因也被克隆到某些杆状病毒的基因组中,以提高病毒杀虫剂的杀虫效果。例如,从杉树芽虫中分离得到的核转录调节因子 CHR75 和 CHR3,已被克隆到杉树芽虫杆状病毒中;从烟草天蛾幼虫中分离得到的核转录调节因子 MHR3 被克隆到 AcMNPV 中。一般来说,如果引入的外源基因是来自于该杆状病毒的宿主昆虫,那么,其在重组病毒感染这种昆虫过程中的表达是最有效的,因为同一种昆虫宿主的细胞可能提供有效的基因表达所需的调节因子。

由于杆状病毒基因组本身比较大,直接把外源基因片段插入到基因组中在技术上比较困难。因此重组病毒的过程一般分两步进行。首先构建重组的基因转移质粒载体,即首先把外源基因插入到一个质粒载体中,然后用重组的转移质粒载体与杆状病毒 DNA 一起转入感染离体培养的昆虫细胞,由于转移质粒载体 DNA 在外源基因两端和病毒 DNA 在被置换的基因两端都带有相似的 DNA 片段,因此,在转感染时,两种 DNA 分子之间就有可能发生重组,从而把外源目的基因导入到病毒基因组中。外源基因是否已经转移进入到病毒基因组中,可以通过许多方法,例如 Southern blot, Northern blot, PCR, Western blot,

酶活性试验,限制性内切酶切割等方法来检查。另外,目的外源基因也可以与一个标记基因连接起来,当它们表达时产生一种连接蛋白,可以通过测试标记蛋白的存在而间接决定目的基因是否已插入到病毒基因组中并已表达。目标标记基因主要有半乳糖苷酶,氯霉素乙酰转移酶,绿荧光素等基因。

外源基因一般都被置于一个转录调节区(启动子)的控制之下,这样可以通过启动子调节外源基因在重组病毒中的表达。目前,所采用的启动子主要是病毒基因表达的启动子,包括多角素启动子、p10 启动子、p35 启动子、IE1 启动子和脱皮激素 UDP 葡糖基转移酶启动子等。启动子可以连接到待表达的单个基因或多个基因的 5' 末端,也可以把不同的待表达基因连接到不同的启动子中。不同的启动子和目的基因的组合,可以加强对目的基因的表达和控制。外源基因表达的水平和时间常常是由启动子所决定的。当用 IE1 等早期表达基因启动子时,外源基因在感染早期就表达了,这样有可能缩短杀虫的时间。相反,如果用晚期表达基因启动子如 p10,多角素启动子,则外源基因在病毒感染的后期才表达。

外源基因插入到病毒基因组中的位置也是很重要的。外源基因的插入不应影响病毒的复制繁殖,不应改变宿主范围。目前比较多的是插入到病毒的脱皮激素 UDP 葡糖基转移酶基因、p10 基因、p48 基因及多角素基因等位置上。这些基因被外源基因所取代不会影响病毒的复制繁殖。但取代多角素基因显然不利于病毒的有效性。因为如果没有多角素形成的多角体包埋病毒 DNA,将使病毒 DNA 很容易在大田条件下受干燥和紫外线作用而降解掉。另一种方法是,并不取代任何基因,而把外源基因插入到某个基因如多角素基因的 3' 末端,连接在一起的两个基因表达后产生“融合”蛋白。但这样的重组病毒由于没有多角体包埋病毒 DNA,比较容易降解。

重组后杆状病毒的致病性是由两方面因素决定的。一是由于病毒在昆虫体内不断大量繁殖,消耗虫体营养和能量,破坏其结构及代谢。另一方面是插入的外源基因的超量表达的结果。基因表达的产物导致宿主昆虫的代谢和生理紊乱,或毒性使昆虫神经麻醉。这两方面的因素最终将共同加速受感染昆虫的死亡。要加快重组病毒的杀虫速度,可以通过几个方面来加以改进:

- ①使外源基因处于不同的启动子控制下。
- ②把多个外源基因同时在病毒中表达。
- ③通过基因的改造使所表达的 mRNA 能在重组

病毒中稳定产生,并有效地表达为蛋白产物,或使蛋白产物能分泌到作用位点。了解所表达的外源基因的作用机制,对于增加重组病毒的杀虫效果是非常重要的。一般来说,如果基因产物能直接作用于感染的昆虫细胞,而不需要通过诱导其他新的蛋白或酶合成,杀虫速度则会快些。例如,Bt 毒素在感染的早期就直接作用于昆虫肠细胞,引起昆虫停止进食。而神经毒素等昆虫毒素产生后,须先转移到神经系统才能发生作用,作用效果相对慢了。目前,许多重组病毒的研究都着眼于那些能直接作用于昆虫肠道的蛋白多肽。因为病毒是首先感染肠道并通过肠道进入体内的。如果重组病毒目的基因产物能很快地破坏肠道,就能引起昆虫停止进食,达到减少害虫对作物的侵食的目的。因此,重组基因产物的作用位点对于发展有效的病毒杀虫剂非常重要。

加拿大是一个林业大国,有丰富的林业资源,尤其是北方的冷杉、云杉和松树等。但其林业同样受到严重的虫害。虫害所造成的损失甚至比森林火灾要严重得多。其中最重要的一种昆虫是杉树芽虫(spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*),它占有林业害虫造成损失的 50% 以上,因此,是加拿大林业重点防治的一种主要害虫。长期以来,主要靠喷洒化学杀虫剂来防治。长期喷洒化学杀虫剂的结果造成环境污染和昆虫产生抗药性。因此,加拿大林业部在 1993 年建立了应用生物技术来防治林业害虫的专门研究室,着重研究和开发重组杉树芽虫病毒杀虫剂。

通过多年来大量的基础研究,目前克隆出一个调控芽虫脱皮的核转录因子基因(CHR3),这个基因是芽虫脱皮所必须的。转录因子 CHR3 在体内是由脱皮激素所诱导产生的,当这个基因表达时,就会启动与脱皮有关的一系列基因表达,从而导致脱皮。如果这个基因在非正常的发育时期表达就会导致不正常的脱皮,最终导致芽虫死亡。所以,我们把这个脱皮基因导入到野生型杉树芽虫核型多角体病毒(CfMN-PV)的基因组中,产生一个重组的杉树芽虫核型多角体病毒。这个重组病毒有几个特点:

①CHR3 基因是处于晚表达的非常强的多角素基因启动子的调控下,所以能大量表达 CHR3,加强了病毒杀虫效果。

②这个基因取代了病毒的脱皮激素 UDP 葡萄糖转移酶基因,因而消除了病毒中该基因的产物对昆

虫脱皮的抑制作用,从而加快引起害虫在 CHR3 作用下畸形脱皮。

③这个重组病毒保留了野生型的多角素基因,所以,病毒 DNA 能被多角素包埋形成病毒多角体颗粒,从而保护了病毒 DNA 在野外条件下不至于很快被降解。

④随着 CHR3 基因的导入,一个可供筛选重组病毒 DNA 的标记基因-半乳糖苷酶基因-也被导入到重组病毒中,并置于 p10 启动子的调控之下。这样,方便了对重组病毒的筛选。

⑤重组病毒的 CHR3 基因本身是从杉树芽虫中分离出来的并被克隆到杉树芽虫病毒中,这样实际上并没有向芽虫和病毒这个系统导入外源基因。因此对生态环境是安全的。

当用重组的带有 CHR3 基因的杉树芽虫病毒感染杉树芽虫后,第 2d 开始,CHR3 基因就在幼虫体内大量表达,幼虫随即停止进食,并开始进行不正常的脱皮,例如,身体部分脱皮,头盖畸形发育,最终导致死亡。四龄幼虫的半致死剂量为 60 个病毒包埋体,只是相应的野生型病毒的五分之一。在口服 5000 个病毒包埋体时,四龄幼虫半致死时间少于 6d,比野生型病毒感染芽虫半致死时间减少至少 2~3d。更为重要的是,重组病毒由于能很快引起幼虫畸形脱皮,所以导致幼虫停止进食。重组病毒处理后的第 3d,超过 60% 的幼虫即停止进食,这对于减少杉树芽虫所造成的侵食伤害有非常重要的意义。由于这个重组病毒有效地加快了昆虫死亡并大大减少了昆虫的进食量,因此比野生型病毒更有效地减少了芽虫对杉树的侵害。

杉树芽虫病毒仅感染很少种类的林业昆虫,到目前为止,没有发现这种芽虫病毒感染其他生物的证据。亦未曾发现 CHR3 基因和杉树芽虫病毒的其他基因转移到其它昆虫天敌中,例如肉食性动物,鸟类及寄生生物中。所以,杉树芽虫 CHR3 重组病毒对于生态环境是安全的。

目前,这个重组病毒已经在美国申请了专利,并正准备在北美进行野外试验。由于 CHR3 基因对于其它昆虫同样具有引致脱皮的功能,所以应用所掌握的病毒 DNA 重组技术,我们很容易把 CHR3 基因引入到其它植物如重要的经济作物的害虫病毒的基因组中,从而产生许多重组的昆虫病毒,开发出高效和安全的病毒杀虫剂。