

文章编号: 1674-7054(2021)03-0356-07



伊蚊 3HKT 基因 RNAi 载体构建及口服对伊蚊的致死作用

费小雯¹, 张阳¹, 李亚军², 邓晓东²

(1. 海南医学院基础医学与生命科学学院, 海口 571101; 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, 海口 571101)

摘要: 构建伊蚊 3HKT 基因的 RNAi 表达载体 pMaa71R/3HKTIR, 转化莱茵衣藻, 将得到的转基因藻株喂饲伊蚊幼虫。结果表明, 3HKT RNAi 转基因藻株对伊蚊有一定的致死作用。伊蚊是登革热、寨卡病毒病、黄热病、基孔肯雅病的媒介昆虫; 微藻是蚊子幼虫天然食物, 在自然界广泛存在, 并且小球藻、衣藻等可大规模生产、生产成本低廉, 因此, 可长期将其大规模投放在封闭区域, 形成优势藻种。本研究可为生物杀蚊, 阻断登革热、寨卡病毒病等恶性传染病的流行提供新思路。

关键词: 伊蚊; 莱茵衣藻; 3HKT 基因; RNAi

中图分类号: R 184.31; Q 78 **文献标志码:** A

引用格式: 费小雯, 张阳, 李亚军, 等. 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. DOI: [10.15886/j.cnki.rds wx.2021.03.012](https://doi.org/10.15886/j.cnki.rds wx.2021.03.012)

蚊子是登革热、登革出血热、疟疾、基孔肯雅热、寨卡热、西尼罗河热、流行性乙型脑炎和黄热病等可怕疾病的媒介。2015 年, 仅疟疾就在全球造成了 43.8 万人死亡; 登革热也是一种可怕的由蚊子传播的疾病, 每年在全世界造成 2 万多人死亡; 由于气候变化、全球化和病毒进化, 登革热和其他蚊媒疾病的发病率每年都在上升。中国疾病预防控制中心统计结果表明, 2000—2011 年, 我国登革热发病较多的省份是广东、海南和福建, 就全国范围而言, 登革热发病率不高; 2011 年后登革热发病率迅速上升, 2014 年出现大爆发, 发病人数达到 46 864 例; 2015—2018 年的发病率呈平稳波动^[1], 2019 年又出现明显上升, 发病人数达到 22 599 例, 是近 20 年来的第二个发病高峰^[2]。由于迄今尚无有效的药物能治疗登革热, 也没有安全有效的疫苗, 因此, 多数国家采用控制登革热传播媒介的方法来进行登革热的防治。在我国, 登革热主要以白纹伊蚊(*Aedes albopictus*)和埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)为传播媒介。目前对于这 2 种蚊虫的防控, 主要采用杀虫剂。杀虫剂的使用, 一方面会对环境造成不可逆的污染, 另一方面, 蚊虫对化学药剂的耐受性也在不断增加。因此, 迫切需要一种对环境友好的技术来控制埃及伊蚊和白纹伊蚊。RNAi 是由小分子 RNA 引起目标基因表达沉默的现象, 在农业上, 被广泛用以沉默害虫发育关键基因, 以达到防治农业害虫的目的。饲喂产生 RNAi 效应的整个过程包括取食、dsRNA 从中肠内壁细胞吸收入中肠细胞(环境 RNAi 效应)穿越中肠向其他组织扩散传递(系统 RNAi 效应)。

蚊幼虫一般以水体中绿藻门中个体较小的微藻为食物, 如衣藻、小球藻、栅藻、团藻等。在动物体内, 色氨酸代谢的主要途径是: 色氨酸分解产生犬尿氨酸(Kynurenine, KYN), KYN 继续分解代谢产生 3-

收稿日期: 2020-09-01

修回日期: 2021-02-19

基金项目: 海南省重点科技计划(ZDYF2018124); 国家自然科学基金(31870344); 农业农村部财政专项(NFZX2021); 中国热带农业科学院基本科研业务费专项资金(1630052019012)

第一作者: 费小雯(1973-), 女, 博士, 教授. 研究方向: 热带虫媒病防控. E-mail: feixw2000@hotmail.com

通信作者: 邓晓东(1969-), 男, 博士, 研究员. 研究方向: 藻类生理生化及资源利用. E-mail: dengxiaodong@itbb.org.cn

羟基犬尿氨酸(3-HK)^[3]。3-HK 在动物体内参与氧化应激反应, 会立刻氧化生成大量的活性氧, 具有神经毒性。体外实验结果表明, 向红尾粪麻蝇注射 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 3-HK 可以致使其神经麻痹而死亡。羟基犬尿氨酸转氨酶(3-hydroxykynurenine transaminase, 3HKT)可以催化 3-HK 产生无毒中间体黄尿烯酸, 具有解毒的作用^[4], 所以如果将 3HKT 基因沉默, 可能导致伊蚊的死亡。在利用微藻控制媒介昆虫方面, KUMAR 等^[5]利用按蚊 3HKT RNAi 转基因衣藻控制冈比亚按蚊(*Anopheles gambiae*), 取得一定效果。本研究设计针对伊蚊 3HKT 基因的 RNAi 序列片段, 克隆、连接到中间载体 T282 上, 得到反向重复序列, 最终连接到衣藻特异的 RNAi 表达载体 pMaa7IR/XIR 上。将含有 3HKT 基因反向重复序列的 RNAi 表达载体通过玻璃珠法分别转化衣藻, 利用巴龙霉素的选择和酶切鉴定最终得到含有目的基因反向重复序列的工程藻株。将上述得到的转基因工程藻株, 喂养埃及伊蚊幼虫, 观察统计幼虫的生长、发育、死亡数据。本研究旨在为生物杀蚊, 阻断登革热、寨卡病毒病等恶性传染病的流行提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料 莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii* CC425)为细胞壁缺失的藻株, 购自中国科学院淡水藻种库。藻株接种在 TAP 固体培养基上和 TAP 液体培养基中培养。培养条件: 温度 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 摇床转速 $220\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 光照强度为 $110\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 24 h 全天光照。RNAi 干涉载体 ppMaa7IR/XIR、中间载体 T282 由本实验室保存。其他试剂盒转化菌株购自上海生工生物工程有限公司、大连宝生物有限公司等。

1.2 莱茵衣藻 RNA 提取和 cDNA 制备 莱茵衣藻 CC425 在 $110\text{ }\mu\text{mol}\cdot(\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1})$ 、 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、24 h 全天光照条件下培养, 待藻株生长到对数生长中期, 收集 100 mL 藻液, $12\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 3 min, 去上清液, 取底部藻体, 液氮速冻。利用大连宝生物 Trizol 植物 RNA 提取试剂盒抽提衣藻总 RNA, 并利用大连宝生物公司 cDNA 合成试剂盒将 RNA 反转录合成 cDNA 待用^[6]。

1.3 3HKT RNAi 载体的构建 根据 genebank 上公布的埃及伊蚊 3HKT 部分编码区序列, 通过上海生工生物工程有限公司合成 430 bp 序列。产物连接到 pMD18-T 载体上, 转化大肠杆菌 DH5 α , 挑取单菌落, 以上海生工工程有限公司质粒小量试剂盒提取质粒, 随后进行酶切分析, 得到载体 pMD-3HKT。以 *Hind* III 和 *Bam*H I 分别酶切质粒 T282 和 pMD-3HKT, 回收 3HKT 正向片段, 与 T282 连接, 转化大肠杆菌, 以 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切鉴定重组质粒。以 *Sal* I 和 *Xba* I 酶切上述重组质粒, 并与反向 3HKT 片段连接, 转化大肠杆菌, *Sal* I 和 *Xba* I 酶切鉴定, 得到含 3HKT 回文序列的中间载体, 并克隆进 pMaa7IR/XIR 中, 得到干涉载体 pMaa7IR/3HKTIR。

1.4 莱茵衣藻遗传转化 将 $1\text{ }\mu\text{g}$ 重组质粒 pMaa7IR/3HKT IR、 $500\text{ }\mu\text{L}$ 藻液、 $50\text{ }\mu\text{L}$ PEG8000、 400 mg 玻璃珠在涡旋振荡器上振荡共混 30 s。将混合液体转移到 10 mL 离心管, 温培养 12 h, 然后将细胞均匀涂布在添加色氨酸和巴龙霉素的 TAP 培养基上培养 5~6 d, 待藻落长出后, 进行后续检测和伊蚊的喂食实验^[7]。

1.5 伊蚊饲养和生物学检测 在温度 $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ 湿度 75% 的培养箱内将清水加入大培养皿中, 添加少量饲料, 将产有蚊卵的滤纸放置水中, 光照 2 h 后, 就可以观察到孵化的幼虫。幼虫成蛹后, 将蛹吸出放入伊蚊成蚊饲养笼中, 待成蚊羽化后以蔗糖水喂食成蚊。将 Maa7IR/3HKT IR 转基因工程藻株在 50 mL TAP 培养液中振荡培养到对数生长中期, 每天取出 5 mL 喂食伊蚊幼虫。记录幼虫的长度、存活数量等。

2 结果与分析

2.1 3HKT RNA 表达载体 pMaa7 IR/3HKTIR 的构建 本实验的埃及伊蚊 3HKT 基因全长 1 167 bp(GenBank 登录号: XM_021849682, 蛋白 EAT45177.1, AAEL003508-PA), 其开放阅读框为 1 203 bp, 编码 400 个氨基酸残基, 5'端非编码区长度为 455 bp, 3'端非编码区长度为 143 bp。3HKT 含有 AGAT(丙氨酸乙醛转

氨酶)家族保守区序列。聚类分析显示^[8-9]:埃及伊蚊 3HKT 与白纹伊蚊(*Aedes albopictus*)、致倦库蚊(*Culex quinquefasciatus*)、达氏按蚊(*Anopheles darlingi*) 3HKT 遗传距离较近,其次是果蝇,距离较远的是萤火虫(*Photinus pyralis*)和扁萤虫(*Lamprigera yunnana*)(图 1)。

3HKT RNAi 正向和反向片段的获得:根据 GenBank 上埃及伊蚊 3HKT 部分编码区序列通过上海生工生物有限公司合成干涉片段,克隆进 pMD18-T 后,得到 pMD-3HKT。测序结果表明,克隆的 3HKT 基因片段与埃及伊蚊 3HKT 基因(GenBank 序列号:XM_021849682)序列同源性为 100%。通过 *Hind* III、*Bam* H I 双酶切,将此 469 bp 3HKT 基因正向片段从质粒 pMD-3HKT 上切下来,得到 3HKT 基因正向片段。同样以 *Sal* I、*Xba* I 将反向片段从 pMD-3HKT 切下来(图 2-A, B)。将正向片段与质粒 T282 连接,获得重组质粒。在此基础上连接反向片段,得到含有正向和反向重复片段约 1 200 bp 的中间载体 T282-3HKT(图 2-C)。在此基础上,将中间载体 T282-3HKT 中约 1 100 bp 的重复序列克隆进 pMaa7 IR/XIR,得到 RNA 表达载体 pMaa7 IR/3HKTIR(图 2-D)。

2.2 3HKT RNAi 表达载体转化莱茵衣藻 pMaa7IR/3HKTIR RNAi 表达载体转化莱茵衣藻后,转基因藻株涂布于抗性 TAP 培养基平板上进行筛选,共得到 85 株 3HKT RNAi 转基因藻株。提取转基因藻株 DNA,并对转基因藻株进行 PCR 扩增,鉴定是否含有插入片段,结果(图 3)表明,85 株 3HKT RNAi 转化藻株中 36 株呈阳性。

2.3 饲喂转基因藻株的伊蚊检测 对照组幼虫喂食饲料(鼠粮)、清水、非转基因衣藻 CC425、转 pMaa7IR/XIR 衣藻;处理组幼虫喂食转 pMaa7IR/3HKTIR 衣藻(每组 10 只幼虫,重复 3 次试验),化蛹后移入蚊笼,以 10% 糖水喂养成蚊(图 4)。在相同喂食条件下,与喂食饲料、清水、非转基因衣藻 CC425、转 pMaa7IR/XIR 载体衣藻(Maa7)对照组相比,喂食转 pMaa7IR/3HKTIR 衣藻藻株 3HKT-1、3HKT-2、3HKT-5、3HKT-6、3HKT-8、3HKT-11、3HKT-16、3HKT-19 的伊蚊幼虫在第 2 天开始有幼虫死亡。死亡

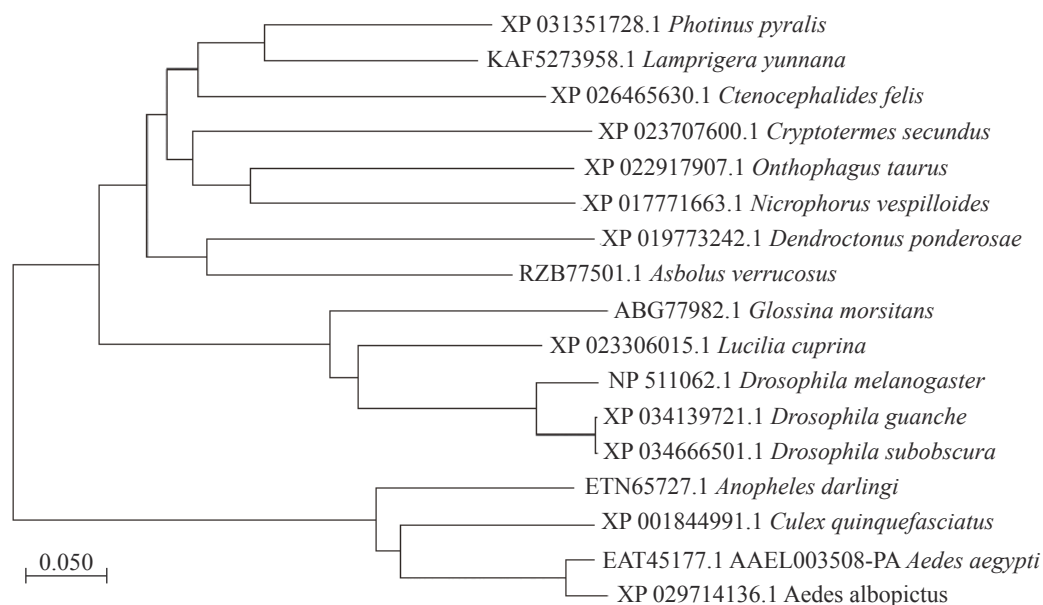


图 1 埃及伊蚊 3HKT 蛋白与其他生物中的同源基因聚类分析

利用邻域联结法推导出进化关系,用 MEGA7 软件进行分析。埃及伊蚊(*Aedes aegypti*),白纹伊蚊(*Aedes albopictus*),达氏按蚊(*Anopheles darlingi*),致倦库蚊(*Culex quinquefasciatus*),萤火虫(*Photinus pyralis*),扁萤虫(*Lamprigera yunnana*),古氏果蝇(*Drosophila guanche*),黄粉虫(*Dendroctonus poerosae*),隐形果蝇(*Drosophila subobscura*),刺舌蝇(*Glossina morsitans*),棕黑疣蠅(*Abolus verrucosus*),堆砂白蚁(*Cryptotermes secundus*),黑腹果蝇(*Drosophila melanogaste*),铜绿蝇(*Lucilia cuprina*),猫栉头蚤(*Ctenocephalides felis*),食粪金龟(*Onthophaves taurus*),黄蜂(*Nicrophorus vespilloides*)。

Fig. 1 Evolutionary relationship of V-ATPA gene in *Aedes aegypti* and the orthologous

The evolutionary relationship was inferred using the Neighbor-Joining method. Evolutionary analyses were conducted in MEGA7.

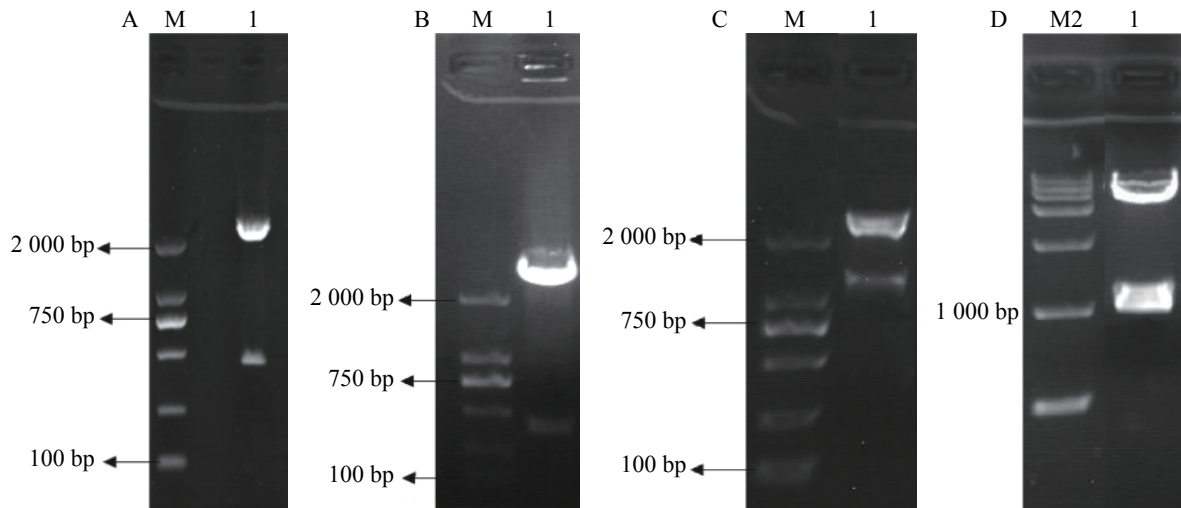


图 2 RNA 表达载体 pMaa7 IR/3HKTIR 构建

A: pMD-3HKT 经 *Hind* III, *Bam* H I 酶切; B: pMD-3HKT 经 *Sal* I, *Xba* I 酶切; C: 含有正向和反向重复序列片段经 *Eco* R I 酶切; D: pMaa7 IR/3HKTIR 表达载体经 *Eco* R I 酶切; M: DL2000 分子量标准; M1: DL10000 分子量标准。

Fig. 2 The construction of pMaa7 IR/3HKTIR

A: pMD-3HKT digested by *Hind* III and *Bam* H I; B: pMD-3HKT digested by *Sal* I and *Xba* I; C: Fragments digested by *Eco* R I containing forward and reverse repeats; D: pMaa7 IR/3HKTIR expression vector was digested with *Eco* R I; M: DL2000 Marker; M1: DL10000 Marker.

率分别是 (30±2)%, (80±5)%, (90±4)%, 100%, (80±3)%, (80±3)%, (40±2)%, (70±3)%。喂食饲料、清水、非转基因藻株 CC425 和转空白载体 pMaa7IR/XIR 藻株的死亡率为 0%。喂食转基因藻株完全死亡的时间分别是: 3HKT-1 第 3 天, 3HKT-2 第 5 天, 3HKT-5 第 4 天, 3HKT-6 第 2 天, 3HKT-8 第 4 天, 3HKT-11 第 7 天, 3HKT-16 第 57 天, 3HKT-19 第 4 天。喂食转空白载体 pMaa7IR/XIR 的藻株 Maa7-2 的死亡率为 (20±2)% (表 1)。结果表明, 3HKT RNAi 转基因藻株对伊蚊有较强的致死作用。

2.4 饲喂 pMaa7IR/3HKTIR 转基因工程藻后体内 3HKT 基因的表达 为了检测埃及伊蚊在喂食转基因工程藻后其体内 3HKT 基因表达是否降低, 在相

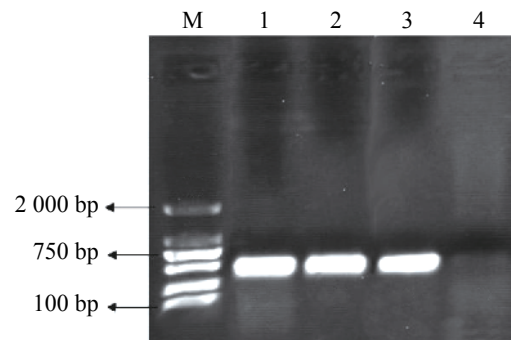


图 3 转基因藻株 PCR 检测结果

M: DL2000 分子量标准; 1~4: 部分 3HKT 转基因藻株 DNA PCR 扩增结果。

Fig. 3 PCR results of transgenic algae strains

M: DL2000 Marker; Lane1-4: PCR amplifications of DNA of the 3HKT transgenic algae strain.

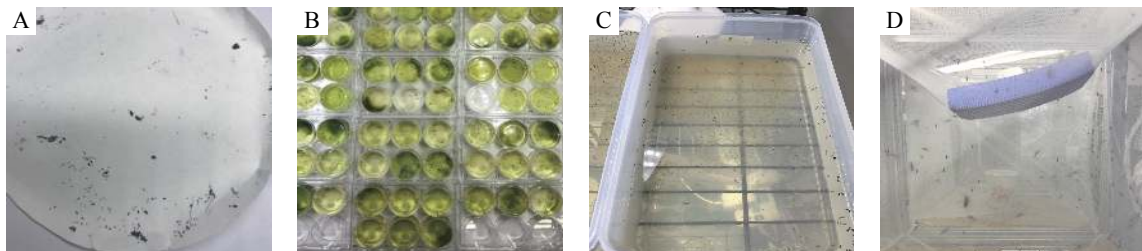


图 4 转基因藻株喂食埃及伊蚊

A: 伊蚊卵; B: pMaa7IR/3HKTIR 转基因衣藻喂养的伊蚊幼虫; C: 幼虫化蛹后移入蚊笼中的清水中; D: 蚊笼中饲养的伊蚊成虫。

Fig. 4 Transgenic algae strains used to feed *Aedes aegypti*

A: *Aedes* eggs; B: *Aedes* larvae fed with pMaa7IR/3HKTIR transgenic *Chlamydomonas*; C: When *Aedes* larvae pupate, they are transferred to the clean water in the mosquito cage; D: *Aedes aegypti* reared in mosquito cages.

表1 喂食 pMaa7IR/3HKTIR 转基因藻株伊蚊的死亡率

Tab. 1 Mortality rate of *Aedes aegypti* fed with the pMaa7IR / 3HKTIR transgenic algae strain

时间 Time	清水 Water	鼠粮 Fodder	CC425	Maa7	3HKT-1	3HKT-2	3HKT-5	3HKT-6	3HKT-8	3HKT-11	3HKT-16	3HKT-19
第1天	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
第2天	0	0	0	0	(30±2)%	(80±5)%	(90±4)%	100%	(80±3)%	(80±3)%	(40±2)%	(70±3)%
第3天	0	0	0	0	100%	(80±5)%	(90±4)%	100%	(90±5)%	(80±3)%	(60±4)%	(90±4)%
第4天	0	0	0	0	100%	(90±6)%	100%	100%	100%	(80±3)%	(60±4)%	(90±4)%
第5天	0	0	0	(20±2)%	100%	100%	100%	100%	100%	(80±3)%	(70±5)%	100%
第6天	0	0	0	(20±2)%	100%	100%	100%	100%	100%	(80±3)%	(80±5)%	100%
第7天	0	0	0	(20±2)%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
第8天	0	0	0	(20±2)%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
第9天	0	0	0	(20±2)%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
第10天	0	0	0	(20±2)%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

注: CC425: 以无转基因的衣藻CC425藻株喂养的伊蚊; Maa7: 用pMaa7IR/XIR转基因藻株喂养的伊蚊 3HKT-1 ~ 3HKT-19; 以pMaa7IR/3HKTIR转基因藻株喂养的伊蚊。

Note: CC425: *Aedes aegypti* fed with the non-transgenic *Chlamydomonas* CC425; Maa7: *Aedes aegypti* fed with pMaa7IR/XIR transgenic algae strain; 3HKT-1 ~ 3HKT-19: *Aedes aegypti* fed with the pMaa7IR/3HKTIR transgenic algae strain.

同的饲养条件下,在幼虫孵育的第4天,以饲喂莱茵衣藻 CC425 伊蚊为对照,检测饲喂 pMaa7IR/3HKTIR 转基因工程藻株伊蚊幼虫 3HKT 表达变化情况。Real time PCR 检测结果(图5)表明,饲喂 pMaa7IR/3HKTIR 转基因工程藻株(3HKT-1、3HKT-2、3HKT-5、3HKT-6、3HKT-8、3HKT-11、3HKT-16、3HKT-19)伊蚊幼虫和饲喂 CC425 对照相比,它们的 3HKT 基因表达量有很明显的降低。饲喂 3HKT-5 伊蚊表达量下降最多,与对照相比下降了 99.25%;其次是饲喂 3HKT-19 和 3HKT-6 伊蚊,它们的 RNA 表达量较对照分别下降 98.66% 和 98.64%。结果表明,实验所选取的工程藻株均能有效沉默伊蚊体内的 3HKT 基因。

3 讨论

近年来,蚊媒传染病严重危害全世界人类的生命健康,成为巨大的公共卫生危害,其中,伊蚊在疾病传播扮演中起十分重要的作用,例如寨卡病毒病、登革热、基孔肯雅病、黄热病等都是由伊蚊传播的。因此,需要一种有效的手段来防控伊蚊,从而达到控制疾病传播的目的。

化学杀虫剂为目前蚊虫控制的主要工具,但是,对化学杀虫剂的严重依赖又造成了很多问题,如蚊虫抗药性问题、杀虫剂对环境对人类健康造成的影响。RNAi 干涉是近年生化分子生物学领域引入的一种防治害虫的新手段。昆虫具有运行 RNAi 机制的基本成分,在不同的昆虫组目中有许多成功的 RNAi 实

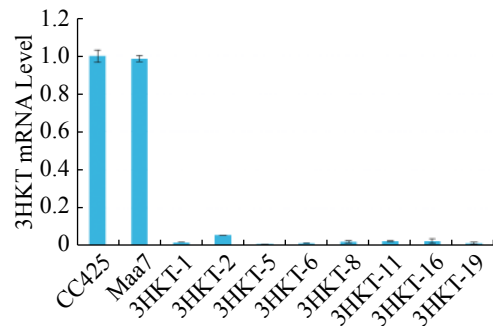


图5 饲喂 pMaa7IR/3HKTIR 转基因藻 4 d 后埃及伊蚊幼虫的相对 mRNA 水平

CC425: 以无转基因的衣藻 CC425 藻株喂养的伊蚊; Maa7: 用 pMaa7IR/XIR 转基因藻株喂养的伊蚊; 3HKT-1 至 3HKT-19: 以 pMaa7IR/3HKTIR 转基因藻株喂养的伊蚊; 每组实验 10 只伊蚊幼虫,重复 3 次,计算平均值得出结果。

Fig. 5 Relative mRNA levels of *Aedes aegypti* larvae after fed with the pMaa7IR/3HKTIR transgenic algae for 4 days

CC425: *Aedes aegypti* fed with the non-transgenic *Chlamydomonas* CC425; Maa7: *Aedes aegypti* fed with the pMaa7IR/XIR transgenic algae strain; 3HKT-1 to 3HKT-19: *Aedes aegypti* fed with the pMaa7IR/3HKTIR transgenic algae strain; each group of 10 *Aedes* larvae was repeated 3 times, and the average value was calculated.

例^[10]。由于 RNAi 能够下调昆虫的靶基因, 因此提出了将其作为控制昆虫种群的新工具^[11-12]。在蚊虫研究方面, RNAi 已被广泛应用于蚊子基因功能和蚊子与病原体相互作用的研究^[13]。在利用 RNAi 干涉防治蚊虫方面, 目前主要采用注射、浸泡、纳米颗粒和微生物等几种方法将 dsRNA 传递到蚊子幼虫中^[13-15]。RNAi 分子(dsRNA、miRNA、shRNA)可以通过浸泡、注射、纳米颗粒包裹或渗透处理(脱水化和再水化)进入蚊子幼虫细胞^[16-22]。另一方面, 利用微生物(细菌、酵母、藻类)传递 dsRNA、miRNA、shRNA 也有成功案例^[5, 23-24]; Kumar 等^[5]利用按蚊 3HKT RNAi 转基因衣藻控制冈比亚按蚊(*Anopheles gambiae*), 转基因藻株致死率平均为 33% 左右, 最高致死率为 53%; 本研究转基因藻株对伊蚊的致死率为 100%。产生不同效果的原因主要是针对的物种差异, 以及选取的 RNAi 沉默片段的差异。

本研究通过向埃及伊蚊幼虫天然食物衣藻转化伊蚊 3HKT RNAi 表达载体, 结果表明, pMaa7IR/3HKTIR 转基因藻株对伊蚊幼虫的成活率、化蛹时间和数量、成虫羽化时间和数量均存在较大的影响。3HKT RNAi 转基因藻株对伊蚊有一定的致死作用。由于微藻是蚊子幼虫天然食物, 在自然界广泛存在。目前, 小球藻、螺旋藻、衣藻等绿藻门微藻均可进行工厂化大规模生产, 相对于转基因伊蚊和沃尔巴克氏体细菌感染伊蚊, 生产成本低廉、技术成熟, 可以长期大规模投放在封闭区域, 形成优势藻种, 逐步消除该地区的伊蚊, 为生物杀虫阻断登革热、寨卡病毒病、黄热病等恶性传染病的流行提供新的思路。

参考文献:

- [1] 杨慧欣, 赵晨皓, 雒静静. 2011—2018 年我国登革热疫情时间序列分析及空间自相关分析[J]. 中华疾病控制杂志, 2019, 23(10): 1250 - 1254.
- [2] 刘起勇. 我国登革热流行新趋势、防控挑战及策略分析[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2019, 31(1): 1 - 6.
- [3] SHELLY T E, WHITTIER T S, KANESHIRO K Y. Sterile insect release and the natural mating system of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) [J]. *Annals of the Entomological Society of America*, 1994, 87(4): 470 - 481.
- [4] HAN Q, FANG J, LI J. 3-Hydroxykynurenine transaminase identity with alanine glyoxylate transaminase. A probable detoxification protein in *Aedes aegypti* [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 15781 - 15787.
- [5] KUMAR A, WANG S, OU R, et al. Development of an RNAi based microalgal larvicide to control mosquitoes [J]. *Malaria World J*, 2013, 4: 1 - 7.
- [6] LI Y J, FEI X W, DENG X D. Novel molecular insights into nitrogen starvation-induced triacylglycerols accumulation revealed by differential gene expression analysis in green algae *Micractinium pusillum* [J]. *Biomass and Bioenergy*, 2012, 42: 199 - 211.
- [7] KINDLE K. L. High frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, 87: 1228 - 1232.
- [8] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4: 406 - 425.
- [9] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33: 1870 - 1874.
- [10] ZHU K Y, PALLI S R. Mechanisms, applications, and challenges of insect RNA interference [J]. *Annu. Rev. Entomol*, 2020, 65: 293 - 311.
- [11] BAUM J A, BOGAERT T, CLINTON W, et al. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nat Biotechnol*, 2007, 25: 1322 - 1326.
- [12] 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 [J]. *Nat. Biotechnol*, 2007, 25: 1307 - 1313.
- [13] AIRS P M, BARTHOLOMAY L C. RNA interference for mosquito and mosquito-borne disease control [J]. *Insects*, 2017, 8: 4.
- [14] BALAKRISHNA P A, NAGARAJAN U, MITRA A, et al. RNA interference in mosquito: understanding immune responses, double-stranded RNA delivery systems and potential applications in vector control [J]. *Insect Mol Biol*, 2017, 26: 127 - 139.
- [15] WHITTEN M M A. Novel RNAi delivery systems in the control of medical and veterinary pests [J]. *Curr Opin Insect Sci*, 2019, 34: 1 - 6.
- [16] SINGH A D, WONG S, RYAN C P, et al. Oral delivery of double-stranded RNA in larvae of the yellow fever mosquito, *Ae-*

- des aegypti*: implications for pest mosquito control [J]. *J Insect Sci*, 2013, 13: 69.
- [17] WHYARD S, ERDELYAN C N, PARTRIDGE A L, et al. Silencing the buzz: a new approach to population suppression of mosquitoes by feeding larvae double-stranded RNAs [J]. *Parasit. Vectors*, 2015, 8: 96.
- [18] LOPEZ S B G, GUIMARÃES-RIBEIRO V, RODRIGUEZ J V G, et al. RNAi-based bioinsecticide for *Aedes mosquito* control [J]. *Sci Rep*, 2019, 9: 4038.
- [19] REGNA K., HARRISON R M, HEYSE S A, et al., HARRISON R M, HEYSE S A, et al. RNAi trigger delivery into *Anopheles gambiae* pupae [J]. *J Vis Exp*, 2016, 109: 53738.
- [20] ISOE J, KOCH L E, ISOE Y E, et al. Identification and characterization of a mosquito-specific eggshell organizing factor in *Aedes aegypti* mosquitoes [J]. *PLoS Biol*, 2019, 17: e3000068.
- [21] CHENTHAMARA D, SUBRAMANIAM S, RAMAKRISHNAN S G, et al. Qoronfleh. Therapeutic efficacy of nanoparticles and routes of administration [J]. *Biomater Res*, 2019, 23: 20.
- [22] LOPEZ-MARTINEZ G, MEUTI M, DENLINGER D L. Rehydration driven RNAi: a novel approach for effectively delivering dsRNA to mosquito larvae [J]. *J Med Entomol*, 2012, 49: 215 – 218.
- [23] TARACENA M L, HUNT C M, BENEDICT M Q, et al. Downregulation of female double sex expression by oral-mediated RNA interference reduces number and fitness of *Anopheles gambiae* adult females [J]. *Parasit. Vectors*, 2019, 12: 170.
- [24] VAN EKERT E, POWELL C A, SHATTERS R G, et al. Control of larval and egg development in *Aedes aegypti* with RNA interference against juvenile hormone acid methyl transferase [J]. *J Insect Physiol*, 2014, 70: 143 – 150.

Construction of RNAi Vector of 3HKT Gene and Its Lethal Effect on *Aedes aegypti*

FEI Xiaowen¹, ZHANG Yang¹, LI Yajun², DENG Xiaodong²

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Hainan Medical College, Haikou, Hainan 571199; 2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology/ Hainan Key Laboratory of Functional Components and Utilization of Marine Biological Resources, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China)

Abstract: Mosquito-borne infectious diseases are seriously threatening the lives and health of humans all over the world. Among them, *Aedes aegypti* is a vector insect that spreads dengue fever, Zika virus disease, yellow fever, and chikungunya. Therefore, the control of *Aedes aegypti* plays an important role in the control and prevention of the aforementioned infectious diseases. In this context, an RNAi expression vector pMaa7IR/3HKTIR of the *Aedes aegypti* 3HKT gene was constructed and transformed to *Chlamydomonas reinhardtii* by the glass bead method. The transgenic algal strains were then used to feed *Aedes* larvae. The results showed the 3HKT RNAi transgenic algae was lethal to *A. aegypti* larvae. Microalgae are natural food for mosquito larvae and they are widespread in nature. Microalgae, such as *Chlorella*, *Chlamydomonas*, etc. can be produced at a large scale in the factory with low cost and placed into closed areas to form dominant algae species. This study provides a new idea for biological mosquito control to prevent the spread of dengue fever, zika virus disease, and other infectious diseases transmitted by mosquitos.

Keywords: *Aedes aegypti*; *Chlamydomonas reinhardtii*; 3HKT gene; RNAi

(责任编辑: 罗启香 责任编辑: 钟云芳)