

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00818682.0

[51] Int. Cl.

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

A01K 67/033 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 4 月 18 日

[11] 授权公告号 CN 1311083C

[22] 申请日 2000.11.29 [21] 申请号 00818682.0

[30] 优先权

[32] 1999.11.29 [33] GB [31] 9928181.8

[86] 国际申请 PCT/GB2000/004541 2000.11.29

[87] 国际公布 WO2001/039599 英 2001.6.7

[85] 进入国家阶段日期 2002.7.29

[73] 专利权人 伊西斯创新有限公司

地址 英国牛津郡

[72] 发明人 卢克·阿尔菲 迪安·托马斯

[56] 参考文献

WO9910488A 1999.3.4

审查员 周 洋

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司

代理人 程金山

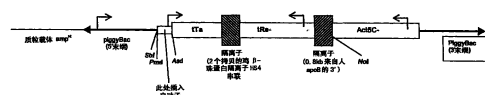
权利要求书 4 页 说明书 81 页 附图 9 页

[54] 发明名称

通过条件显性致死遗传系统进行生物防治

[57] 摘要

本发明涉及携带显性致死遗传系统的非人多细胞生物，它的致死效应是有条件的，其中致死系统的致死效应发生在生物体的自然环境中。



1. 一种在非人多细胞动物的天然环境中对其进行种群控制的方法，包括：

i) 繁殖携带显性致死遗传系统的所述动物的原种，所述繁殖在许可条件下进行，所述显性致死遗传系统的致死效应是条件性的，其中所述致死系统的致死效应在所述天然环境中通过致死基因的表达而产生，所述致死基因的表达是在可阻遏的反式激活蛋白的控制下；
ii) 将所述原种动物释放在用于种群控制的地点的环境中；以及
iii) 通过在从所述原种个体与野生种群的相反性别的个体品种间杂交所产生的后代中表达所述致死系统来实现种群控制。

2. 权利要求 1 的种群控制方法，其中种群控制是通过在从所述原种个体与野生种群的相反性别的个体品种间杂交所产生的后代的胚胎中表达所述致死系统而通过胚胎致死来实现的。

3. 权利要求 1 的方法，其中的条件显性致死遗传系统是该动物中的唯一重组元件。

4. 权利要求 1 的方法，其中所述致死遗传系统的表达在缺少物质的条件下发生，所述物质是从所述动物的天然环境缺少的。

5. 权利要求 4 的方法，其中所述物质是食物添加剂，其不是该动物的正常的食物组分。

6. 权利要求 5 的方法，其中所述食物添加剂是人工的或合成的化合物，抗生素，抗生素类似物或衍生物。

7. 权利要求 1 的方法，其中所述致死系统的条件致死效应不依赖于存在于所述动物的天然环境中的温度范围。

8. 权利要求 1 的方法，其中所述显性致死系统的致死效应是条件性可抑制的。

9. 权利要求 8 的方法，其中所述可抑制的表达系统是通过四环素或其类似物或衍生物可阻遏的。

10. 权利要求 1 的方法，其中所述致死系统在多于一个基因座是纯合。

11. 权利要求 1 的方法, 其中所述致死系统位于 X 染色体。
12. 权利要求 1 的方法, 其中所述致死系统具有多个必需靶标。
13. 权利要求 1 的方法, 其中所述致死遗传系统包括果蝇的 *Nippl* Dm 基因的全部或部分, 或其功能性等价物。
14. 权利要求 1 的方法, 其中所述致死基因是选自反义 RNA, 有义 RNA 和双链 RNA 的抑制序列。
15. 权利要求 1 的方法, 其中所述的动物是昆虫。
16. 权利要求 15 的方法, 其中的昆虫选自: 铜绿蝇 (*Lucilia cuprina*), 白纹伊蚊 (*Aedes albopictus*), 日本弧丽蚱 (*Popilla Japonica*), 白缝象 (*Graphognatus spp.*), 吴刺粉虱 (*Aleurocanthus woglumi*), 芒果大实蝇 (*Dacus dorsalis*), 橄榄大实蝇 (*Dacus oleae*), 热带实蝇 (*Dacus cucurbitae*, *Dacus zonatus*), 地中海蜡实蝇 (*Ceratitis capitata*), 纳塔耳实蝇 (*Ceratitis rosa*), 樱桃绕实蝇 (*Rhagoletis cerasi*), 昆士兰芒果实蝇 (*Bactrocera tryoni*), 加勒比海实蝇 (*Anastrepha suspensa*), 外来火蚁 (*Solenopsis richteri*, *Solenopsis invicta*), 舞毒蛾 (*Lymantria dispar*), 苹果小卷蛾 (*Cydia pomonella*), 黄毒蛾 (*Euproctis chrysorrhoea*), 黄热病伊蚊 (*Aedes aegypti*), 疟疾按蚊 (*Anopheles gambiae*, *Anopheles stephensi*), 旋丽蝇 (*Cochliomyia hominivorax*), 蛆症金蝇 (*Chrysomya bezziana*), 舌蝇 (*Glossina spp*), 墨西哥棉铃象 (*Anthonomus grandis*), 束翅亚目昆虫 (*Enallagma hageni*), 差翅亚目昆虫 (*Libellula luctuosa*), 和三化螟 (*Tryporyza incertulas*)。
17. 权利要求 1 的方法, 其中的致死遗传系统是性别-专一性的或性别实体或组织专一性的。
18. 权利要求 17 的方法, 其中的致死效应在所述动物的一个生活周期阶段是性别-专一性的或性别实体专一性的, 但在另一阶段不是专一性的。
19. 权利要求 18 的方法, 其中所述致死效应是胚胎专一性的。
20. 权利要求 17 的方法, 其中该动物不含有是非条件化的并且在每一个体中都表达的显性的性别-专一性致死遗传系统。

21. 权利要求 17 的方法，其中的致死效应是雌性或雌性组织专一性的。

22. 权利要求 1 的方法，其中释放雄性和雌性。

23. 权利要求 1 的方法，其中释放一种性别。

24. 权利要求 23 的方法，其中在动物释放前，不同性别的动物被分开，并且这种性别分开是通过权利要求 17-21 任一项定义的动物里表达性别专一性致死遗传系统来实现的。

25. 权利要求 1 的方法，其中致死效应造成杀死超过 90%的释放的动物与野生种群间的交配的子代的靶类。

26. 一种产生用于种群控制的动物的方法，包括在允许条件下的依照权利要求 1 的繁殖动物原种的步骤。

27. 一种用于动物的性别分离的方法，其中在动物中表达权利要求 17 的性别专一性显性条件致死系统被用于消灭一种性别而留下纯的或占优势的雄性或雌性种群；其中动物包含雄性或雌性组织的种群；或其中动物不能产生功能性雄性配子或雌性配子或两者的种群。

28. 用于权利要求 1 的方法中的动物细胞，其携带条件性的显性致死遗传系统，其致死效应是条件性的，其中所述致死系统的致死效应发生在所述动物的天然环境中，前提是所述系统不包含 tTA 启动子和触角基因。

29. 多核苷酸序列，其编码条件性显性致死遗传系统，并且编码 Nipp1 基因，其中所述显性致死遗传系统的致死效应是条件性的，并且在可阻遏的反式激活蛋白的控制下在所述多核苷酸转化的动物的天然环境中通过致死基因的表达而产生，并且所述动物的繁殖在许可条件下进行。

30. 权利要求 29 的多核苷酸序列，其包含 SEQ ID NO:1。

31. 一种或多种载体，其包含权利要求 29 的多核苷酸序列。

32. 权利要求 31 的载体，其包含四环素-阻遏的显性致死基因或遗传系统。

33. 权利要求 31 的载体，其包含至少一个隔离子序列。

34. 权利要求 33 的载体，其中所述隔离子序列衍生自脊椎动物

DNA。

35. 权利要求 31 的载体，其中所述载体包含调节模块化的遗传元件。

36. 一种构建适于将显性致死遗传系统传递给动物的载体的方法，其包含以下步骤：

- i. 提供至少一个条件性致死遗传系统；
- ii. 选择适于在需要动物中表达所述系统的启动子；
- iii. 将所述启动子与所述条件性致死遗传系统相连接，任选地，与其它组分相连接，以产生适于转化的功能性载体；

其中所述载体转化到所述动物中产生用于种群控制的动物，其中所述致死系统的致死效应是条件性的，并且在可阻遏的反式激活蛋白的控制下在所述动物的天然环境中通过致死基因的表达而产生，并且所述动物的繁殖在许可条件下进行。

37. 一种细胞，其包含权利要求 31 的载体。

通过条件显性致死遗传系统进行生物防治

本发明涉及控制生物种群的方法。

发明背景

已知生物防治昆虫和植物的多种方法。目前使用的一种控制昆虫种群的方法称为“不育昆虫技术”(SIT)，也称作“不育昆虫释放方法”(SIRM)。这种方法中，将不育的雄性释放到环境中，它们与野生型(能生育的)雄性竞争配偶。与不育雄性交配的雌性不产生后代，因此大量释放不育雄性可以导致下一代数量降低。这样就控制了野生型种群的数量。

SIT 需要昆虫绝育的某些机制。此外，SIT 通常要将雄性和雌性分开，只释放一种性别。这在农业害虫中是需要的，例如地中海果蝇，即使雌性是不育的，仍然会损害果实。类似的，只有雌性蚊子叮咬人类。在这种情况下，最好避免释放雌性昆虫。

目前达到绝育和性别分离的技术都有缺点。在有些情况下，可以通过诸如蛹块或羽化的时间等标准分离雄性和雌性，但这些方法不能可靠的产生单一性别种群。分离雄性和雌性经常包括使用突变种，突变的目的是诱导性别间的可见的或可选择的区别，但这种突变会降低产生的家系与野生型的适合度，这是不希望看到的。

在绝育过程中可能会产生进一步的适合度降低，其中给予昆虫绝育剂量的放射(X 射线或伽玛射线)，或化学绝育。经常地，诱发绝育所需的化学药剂的剂量或放射的剂量与致死该生物的剂量是类似的。这样，绝育生物常常在交配能力上是有损伤的。另外，化学和放射方法使用的技术对靶生物不是专一性的，对工人有潜在的危险。两种方法均造成环境危险，因为需要处理放射源或化学药剂。此外，在使用诸如铯源的放射源时有固有的危险和额外的劳动力花费。

Fryxell 和 Miller (经济昆虫学杂志 (Journal of Economic Entomology), Vol 88, No 5, pages 1221-1232) 公开了昆虫控制的替代策略, 使用含有在野生的适当的冷条件下表达的显性致死基因的果蝇。但是, 这种方法由于不同的地域条件即环境不能提供适当的冷条件时无效。此外, 生活在不同温度栖息地的生物不能在所有条件下受控。

Asburner 等 (昆虫分子生物学 (Insect Molecular Biology), 1998, 7(3), 201-213) 公开了用外源 DNA 转化昆虫品种产生转基因品种的方法。

DeVault 等 (生物技术 (Biotechnology), Vol 14, January 1996, page 46-49) 公开了 SIT 方法的改进的两步方法。首先通过表达稳定插入的与雌性专一性启动子连接的致死基因分离, 表达后杀死雌性并只产生一种性别。然后通过放射或化学处理将保留的雄性绝育并释放到环境中。然而, 这种方法有上面所述的缺点, 释放的昆虫由于绝育处理而降低了适合度。此外, DeVault 的文章公布了将这种遗传性别步骤与第二种遗传系统结合使用, 可能绝育或延缓天然种群的耐性。

本领域仍然需要避免了上述方法的问题的生物防治方法。

本发明的目的是克服这类问题。

发明概述

在第一个方面, 本发明涉及一种携带显性致死遗传系统的非人多细胞生物, 该系统的致死效应是有条件的, 其中致死系统的致死效应发生在该生物的天然环境下。

在相关的方面, 本发明涉及在可控制条件下的实验室中可生存的生物。可控制条件是该生物的自然环境中不存在的条件。这样, 该条件典型的是人工条件。除去可控制条件可以使致死遗传系统表达。该生物可以是自致死的, 因为它可以在释放到环境中后被杀死。适当地, 该生物可以将致死元件传递到至少一些后代从而至少使一些后代亦被杀死。

本发明的生物可以用于种群控制, 通过交配传递致死遗传系统, 并阻断野生型生物潜在地高产的交配。本发明的生物分布到环境中从而起始了生物防治系统。本发明的生物不需要绝育, 从而避免了通过放射绝育和遗传适合度损失的有关的问题。

在另一个方面，本发明提供了生物防治的方法，包括：

- i 在许可条件下培育雄性和雌性生物的原种，让雄性和雌性存活，提供双性别生物防治制剂；
- ii 将该双性别生物防治制剂释放到需要生物防治的位置的环境中，以及
- iii 通过生物防治制剂的个体与野生种群相反性别的个体的杂种繁殖产生的后代中的遗传系统的表达达到生物防治。

优选的，释放的生物没有专门的绝育步骤。

此外，我们发现了生物防治的新方法，可用于能够进行有性繁殖的生物，其中只需要一种致死遗传系统，它的表达可用于性别分离和生物防治。在这种情况下，将致死遗传系统制成性别-专一性的。致死遗传系统优选地是条件显性性别-专一性致死遗传系统，它在生物的天然环境的限制条件下表达。但是，致死遗传系统的表达可以控制在实验室、工厂，或其它调节的系统的许可条件下，例如允许正常种群，即有两种性别的昆虫原种（stock）的生长。在将工厂或实验室原种释放到环境中之前，可以控制条件保证只有该生物的一种性别的种群释放到环境中。不需要另外的该生物的辐射并且这种安排不需要使用两种分离的遗传系统（即 De Vault 等使用的用于性别分离的和，例如绝育的系统）。只需要构建一种遗传系统并插入到生物中，这样使这种方法简便快速。

这样，在本发明的另一个实施方案中，该多细胞生物携带是条件性的显性性别-专一性致死遗传系统，并且不含有非条件性和在每一个体中均表达的显性性别-专一性致死遗传系统。

具体地，在许可条件下，本发明的生物中的致死遗传系统是不表达的，可以繁殖一个原种（stock）的许多生物体。然后，施加限制条件杀死一种性别（例如雌性）。保留的性别（雄性）可释放到环境中，并且该遗传系统被传递到至少一些通过上述雄性与同种的野生生物的有性繁殖产生的后代。条件显性致死遗传系统这样选择，使致死系统在天然环境中表达。结果是，对于雌性专一性致死遗传系统，从交配产生的所有的雌性由于该遗传系统的作用而被杀死或使其不能存活，而雄性存活以便将该系统以一定比例传递到下一代。这样，就实现了生物防治。

如果需要，可以将许可条件下培养的生物的原种释放到环境中，而不需要在释放前加以限制性条件杀死一种性别。这种变化允许使用计时机制，例如生活周期阶段，来制造生物防治制剂。也就是说，在释放到环境中之前施加限制性条件是被除了，例如工厂/实验室条件预-确定的变化的事件程序化的。例如，释放正常种群的幼虫制造出有用的时间-分散或延迟的释放剂。这就意味着个体幼虫可以以不同的速率发育成熟，并且这样可以在一定时期内释放单一性别的遗传工程种群并因此在该时间内产生最大可能的与有性活力的野生种群相互作用。这一方面与在单一时间点释放单一性别种群的遗传工程成虫相比是有优势的。还有其它的优点，显著的是最后的（最大的）一代不是必需要在工厂、实验室或其它可调节的环境中饲养，从而节省空间和食物，并且因此是更经济的方法。此外，该释放的幼虫会与野生种群的幼虫竞争，通过密度依赖机制增加死亡率。作为举例说明，这种变化对蚊子可能是有用的，它们的幼虫对人类是无害的，但不适于地中海果蝇 (medfly) 和苹果蠹蛾 (codling moth)，它们的幼虫吃果实。

因此，本发明的进一步的方面提供了一种生物的生物防治的方法，该生物有分散的有性实体，该方法包括以下步骤：

1. 生产遗传工程生物体的原种；
2. 将遗传工程生物体以下列形式释放到环境中：
 - a) 在知道雌性会死亡而只有雄性发育成熟到成虫的生物的生活周期的某一阶段，例如幼虫，以正常种群（即含有两种性别）释放，或者
 - b) 以单一性别种群释放，即在释放前表达了性别专一性显性致死效应。

本发明依赖于能够性别专一性致死的条件显性致死遗传系统的表达，以除去一种性别实体。该致死基因的条件表达是使得致死效应发生在生物体的天然环境中以达到生物防治。

在本发明的另一个方面，发明相应的包含第 3 个步骤；

- 3 使生物防治发生。

本发明进一步提供了生物防治的方法，包括：

在许可条件下培育雄性和雌性生物的原种，使雄性和雌性成活，提

供双性别生物防治剂；

任选地，在下一个步骤之前，施加或允许限制性条件来致死一种性别的个体从而提供了单一性别生物防治制剂，包括携带条件显性致死遗传系统的另一种性别的个体；

释放该双性别或单一性别的生物防治剂到需要生物防治的地点的环境中，以及

通过在由生物防治制剂个体与野生种群的相反性别的个体的杂种繁殖产生的后代中表达该遗传系统获得生物防治。

本发明还涉及将含有条件显性致死遗传系统的生物体，用于性别分离和生物防治的组合方法，如此处所述。

本发明进一步提供了在生活周期的多个阶段具有致死性的多-相致死系统。特别的，本发明提供了用于生物防治的生物或单一性别种群，其中的生物或单一性别种群在限制条件下，例如自然环境中与相反性别的野生型交配后产生没有存活力的后代。例如，本发明提供了雄性种群，其产生没有存活力的雄性或雌性后代。这与单一雄性种群不产生雌性后代而产生有存活力的雄性后代相反。

本发明又一方面提供了生物体性别分离的方法，其中性别专一性显性条件致死系统的表达用于杀死一种性别而保留基本纯的雄性或雌性种群，或其中的生物体含有雄性或雌性组织的种群，或者其中的生物体不能产生功能性雄性配子或雌性配子（或两者均不产生），如果不是表达致死遗传系统，它们是能够产生的。

本发明进一步提供了生物防治的方法，其中许可条件下的生物体的原种的生长一旦开始，即可自我维持并且不需要加入另外的集合的生物体来用于其维持。

本发明还提供了生物防治的方法，其中致死遗传系统的表达发生在缺乏生物体天然环境中缺乏的物质时，从而在释放该生物时，保证了有效的生物防治。

本发明又提供了一种载体，用于转化生物体产生本发明的生物，其适用于生物防治方案。

发明的一般描述

为了易于理解，在具体的详细描述之前，首先对本发明的一般特征进行广义的描述。此处讨论的本发明是关于生物防治方法中使用的生物体以及生物防治的方法。因此，提及生物体通常包括使用该生物的生物防治的方法，反之亦然。

本发明的非人生物适宜地是一种重组体生物，其中向它转化了显性致死遗传系统。该生物体亦至少能够进行有性繁殖或试图进行有性繁殖，这样使显性致死遗传系统能传递到该生物体的天然存在的生物种群，或者该生物能够与野生型生物体竞争交配。

该致死遗传系统适宜地由致死基因和控制和/或调节元件构成。但是，在一个实施方案中，该致死遗传系统可以简单地只由致死基因构成，足以产生致死效应。

该显性遗传系统适宜地包含显性基因，它的效应在杂合子状态下表型地表达。这种显性效应保证了，如果生物体只接受了一个拷贝的致死遗传系统，则在该生物体的天然环境下，该系统的致死效应仍然施加到宿主。

该致死遗传系统可以是性别专一的或非性别专一的，优选的是前者。对性别专一性致死系统的情况，可能在释放生物体进行生物防治前进行遗传性别-选择。

当需要单一性别生物防治制剂时，通常通过在培养原种生物时除去许可条件，导致该遗传系统的性别专一性致死效应被证实的方法分离有性实体。然后，分离到保留的单一性别的种群。

我们优选该致死效应是雌性专一性的。但是，在某些情况下可能需要雄性专一性致死效应。对于植物，性别实体不需要是分离的生物体，而是同一生物体的不同部分。本发明也可以用于植物，其中杀死了植物的一种性别实体。对于单一性别生物防治制剂，条件显性致死遗传系统允许在释放前的生长周期中表达，然后分布该植物。可替代地，在释放前可能需要这种许可的不表达，例如在有致死效应的种子分布时，仅仅在植物一旦在环境中达到其生活周期的特定的进一步的阶段时才得以证实。

对于昆虫和其它动物，分布生物体典型地通过释放生物体到环境中来实现。对于植物，分布典型地通过种植成熟植物、苗或种子或任何在环境中生物体的适合形式来实现。

除了在定义的许可条件下之外，均可观察到显性致死遗传系统的条件效应。本发明的限制条件发生在生物体的天然环境，并且是允许表达该致死系统的致死效应的条件。使该生物存活的许可条件只在调节的生长环境中采用许可条件时存在。

优选地，该显性致死遗传系统的表达是有条件的，基于在天然环境中不存在的某种物质或条件，诸如人工或合成化合物，适宜的是抗生素，抗生素类似物或衍生物的存在。这种人工物质或条件在天然环境中适宜地总是不存在的，即它在天然环境中永远不会或只是很少地以足够的丰度或浓度存在从而灭活或功能性抑制致死遗传系统。优选地，该物质或条件的缺少导致表达该致死系统的致死效应。

生物的天然环境通常是需要控制的种群所处的或存活的环境。另外，天然环境也是提供必要的限制条件的环境。本发明的通用性质使本发明的方法有广泛的应用，并且因此，该天然环境可以是世界上任何需要生物防治的环境，没有限制。

发明详述

本发明的致死遗传系统可以是任何能够产生致死效应的遗传元件或元件的组合。我们优选该致死遗传系统含有编码潜在致死基因产物的 DNA 序列（致死基因）以及控制元件诸如启动子、增强子或反式-激活组件。调节该基因的元件优选地与致死基因位于同一染色体，或在不同的染色体。我们特别优选的致死系统是其表达处于阻遏反式激活蛋白控制之下的致死基因。在另一个实施方案中，致死系统可以简单的只有单独的致死基因，或与其天然启动子组合。

优选地，本发明的生物只有一种致死遗传系统，该系统对环境因子是条件性的。更优选地，该系统只有一种条件致死基因。使用简单的遗传系统最小化了产生或实施本发明的遗传复杂化的机会。典型地，除了本发明的致死遗传系统的之外，该生物体不含有转基因或其它非天然基

因或 DNA 排列。

该致死系统的致死效应可能影响整个生物，或靶向生物体内特定组织。例如，在植物中，致死效应可以靶向只是宿主植物的一部分，诸如植物的一种性器官。这样，在本发明中，不需要使用外加的制剂诸如辐射或化学品进行绝育，而是通过使用基于合子致死或雄性或雌性或全绝育的靶向致死的使用达到野生型种群大小的降低。

特别地，在植物中，我们优选致死效应靶向植物中的产生雄性和/或雌性配子的组织或其关键部分的前体，这样当植物在天然环境中生长时这些组织会死亡。使用这种方法，除非生长在许可条件下，植物不会产生花粉或种子，或两者均不产生。考虑到遗传修饰植物的一般环境，本发明因此特别适用于在另一个位置是转基因的植物。然后，该转基因植物不会释放花粉或种子，并且不能异花传粉其它种类或其它方式传播到环境中。这在植物有风媒花粉 (wind-blown pollen) 时特别有用。在这种方法中，可以包含转基因植物，并且转基因植物可以在商业化之前进行田间研究中生长用于检测而不会有环境风险。

这样本发明就涉及田间测试转基因作物的方法，包括在许可条件下培育含有本发明的条件致死显性系统的转基因植物，并且然后，将植物分布到暴露于限制条件的环境等步骤。田间实验 (field testing) 一般可以是任何对转基因植物的测试来评价它的特性，诸如举例来说，它作为作物或粮食的商业适用性的实验。本发明还扩展到将本发明的条件致死显性系统与一种或多种转基因组合的植物。

致死效应还可以靶向生物体的特定生活周期阶段。当寻求生活周期专一性时，我们优选本发明的致死是胚专一性致死。致死相适宜地在生物释放的发展阶段之前结束，或者在释放后失去适合性或死亡。对于昆虫，胚胎致死保证了不会出现幼虫来损伤作物或动物。这一点对疾病载体诸如蚊子不太重要，这些疾病载体只有成虫阶段才传播疾病，但是，对很多作物害虫特别重要，这些作物害虫的幼虫会造成经济损失。胚-专一性致死使最后和最大量饲养的一代用缺乏阻遏物的食物饲养，降低了花费。胚-专一性致死还可以与随后的性别-专一性致死，例如雌性-专一性致死组合。在这种情况下，我们证明这可以构建这种品系，该品系在

释放前的最后一代撤去许可条件后自动造成性别分离和“不育”。

在某些情况下，也优选的是晚期-作用致死，它利用了密度-依赖的负选择的特征，此时个体存活到繁殖的机会与它所属的种群中的个体的总数目是负依赖的。这种机制的典型的是个体间竞争有限的资源，例如食物。举例说明，对于蚊子，这种竞争可能作用于幼虫竞争食物。如果致死期比此幼虫竞争期晚，则致死系统将会杀死的个体（例如雌性幼虫）仍然将在其幼虫阶段竞争资源并间接降低它们的同种的数目，即使那些根本未携带该致死系统的也是如此。因此，优选的致死系统是在允许本发明的生物与野生型生物发生竞争的生活周期阶段致死。

优选地，致死表达是这样的，使得个体在造成我们希望避免的损害之前死去。作为例子，对于蚊子，需要降低疾病传播。雌性蚊子可以传播疾病的最早是在第二次吸血（从第一次吸血获取寄生虫/病毒并成为传染性的）。因此，最晚应该在第一次吸血后不久杀死蚊子。此外，我们不希望饲养蚊子，优选的是在第一次吸血不久之前或之后立即杀死。

该致死遗传系统的致死基因可以是任何能够造成宿主死亡或导致宿主死亡的遗传元件。特别地，该术语包括能够发挥致死效应的基因片段，而不限于全长基因。任何能够施加可以是条件控制的致死效应的元件均包括在本术语中。

对本发明而言，显性致死基因的选择不是关键的。现存广范围的有不同的毒性的适当的基因产物。例如细胞信号传导或细胞周期基因的显性突变形式适用于本发明。导致这类基因过量表达的构建体也可以是致死的。类似地，导致关键基因表达不足的构建体也可以是致死的。这可以通过表达抑制序列，例如反义 RNA、有义 RNA（通过基因沉默起作用）、双链 RNA（“抑制性 RNA”或 RNAi）或其它抑制性 RNA 分子来达到。必要功能的蛋白质抑制剂的过量表达也可以造成此致死作用。工程构建体的其它的适当的靶包括破坏细胞的代谢或调节至致死程度的基因，诸如胞外信号传导因子的破坏或过量表达，诸如 Wnt、Shh、TGF β 等的功能性同系物。优选的致死基因是此处的实施例中描述的基因，*hid* 基因[参看 Heinrich and Scott, P.N.A.S July 18 2000, volume 97, 15, 8229-8232]，以及 *NipplDm* 基因，一种哺乳动物 NIPPI1 的果蝇同系物（参看实

施例 7)。其它可能的致死基因包括可以有转化生物体性别的作用的性别决定基因。这种情况下，雌性转化为不育的雄性也可以获得生物防治，并且该致死基因是对该种群本身致死而不是专一性针对该生物。当使用高毒性基因产物时，诸如白喉毒素和蓖麻毒素 A，我们优选的是基因的表达仅在足以杀死该生物的水平，而具有最小的环境影响。

本发明中使用的优选致死基因有其毒性阈值-低于特定水平是无害的而高于该值是致死的。另外，为了降低可能的抗性，致死基因优选的有多个必要的靶。Nipp1Dm 通常符合这些标准。它编码一种在所有细胞中以显著水平存在的高度保守的蛋白质。适度的过度表达因而不会造成任何副作用。它是果蝇中三个必要的基因的有效抑制剂，三个基因中任何一个都具有高度多效性效应。相应的，由于这种蛋白质在线虫 (*C. elegans*)、黑尾果蝇 (*D. melanogaster*) 和哺乳动物中的高度保守，Nipp1Dm 是本发明中优选使用的致死基因。

致死系统的条件性性质使重组生物体可以在允许生物生存的条件下，例如工厂或实验室培育，然后释放到天然环境。致死系统的致死效应是这样控制的，使得可以使该释放的生物能够繁殖，并且有性繁殖使该致死系统传递到野生型种群，杀死所有或特定群的生物。我们优选的是该致死效应导致杀死大于 90%的靶类的在该释放的生物和野生种群之间交配的后代。该靶类可以是，例如雌性，即后代的 50%。更优选地，该致死效应导致杀死 95%的靶类，再优选地 99%和最优选地 100%杀死环境中的靶生物。

致死系统的条件特性可以对取决于任何适宜的因素，诸如温度，日昼循环（光持续时间和/或强度作为因子）或信息素。在这种情况下，在许可温度下饲养重组体原种，并释放到有限制温度环境中。适宜地，致死效应在至少 5°C 的温度出现，更优选地在 10°C，更优选地在 20°C，在已知该生物在世界上环境中所遇到的极限温度范围内，使得在环境中一直表达致死效应。

优选地，该致死系统的致死效应本质上在对生物体的天然环境中出现的温度变化或波动是不敏感的。

如果致死系统的表达不是温度条件性的，但在某种程度上是温度敏

感的，我们优选的是 90%以上的生物在自然环境中死亡，更优选地至少 95%，优选地至少 98%，优选地至少 99%或更多。

本发明的致死遗传系统通常在相当程度上对温度是不敏感的，因此例如，在 18°C 和 29°C 的致死效应的差别低于 5%，优选地低于 1%。本发明的优选的致死遗传系统在宽广的温度范围是适当地起作用的，诸如可以在发现该生物的环境中天然发生。典型的温度范围的例子是 0°C 至 50°C，更通常的是 10°C 至 45°C，诸如 15°C，20°C 或 25°C 至 30°C，35°C 或 40°C。优选地，该致死效应在此整个温度范围内表现在至少 95%的生物中，其中在该范围内的任何温度下 95%的生物被杀死，更优选地 98%，99%或更多。更通常地，在任何温度下的最高存活率优选地低于 10%，适当地为 5%，2%，1%或更低。

当将生物体分布到其天然环境中或任何天然存在的环境中时，无论是可以出现的天然条件还是环境中常有的条件，该致死系统的致死效应均优选地在该天然环境中表达。

我们优选的致死系统的致死效应对饮食添加剂是条件化的，诸如食物或水添加剂，对于靶种类而言它们不是正常食物组分。这样使重组原种在含有该添加剂的食物或水上生长，避免了致死效应。在释放到野生环境后，生物体没有暴露于添加剂，该致死系统的致死效应在本发明的重组生物体的交配的后代中表达。在某些情况下，可以在亲本生物体表达，虽然该释放的生物体必须存活的足够长以进行交配。

使致死系统的表达成为条件性的优选的因子包括抗生素诸如四环素和及其非抗生素的四环素类似物和衍生物，它们与本发明的优选的四环素阻遏系统共同起作用。非抗生素化合物是特别优选的，可以避免环境中积累抗生素的潜在问题。适当的类似物包括表氧四环素（epioxytetracycline）和脱水四环素（anhydrotetracycline），虽然其它的适当的类似物也可以在合适时使用。

当致死效应对饮食添加剂是条件性的，子代可能不需要自己摄食或吸收该饮食添加剂即可存活。例如，子代可能不需摄食即可从亲代或从早期生活周期阶段保留了足够的添加剂，或至少，子代会缓慢失去添加剂。这种效应在限制条件下完全表达致死效应之前可能会传递一代或几

代。

我们优选的本发明的重组多细胞生物含有显性致死系统，其致死效应是条件性可抑制的。在这种方式中，致死效应在控制条件下被抑制，但在生物的天然环境中不受抑制。但是，也有其它方法获得条件表达（例如，条件激活），它们中的任何一个均可用于本发明。

我们特别优选的阻遏表达系统是四环素阻遏系统，其中四环素，或其类似物或衍生物用于抑制致死系统的表达。在此处的实施例中详细描述了昆虫的一个适当的系统。这种四环素系统也表明适用于植物（参看 Zuo and Chua, 2000, Curr. Opin. Biotech. 11:146 及其参考文献）。

阻遏 *lac* 阻遏物系统是较不优选的，因为诱导剂（IPTG）不易扩散并且比四环素更具毒性。

相反的，可诱导系统可以基于毒素的组成型表达和毒素的阻遏物的诱导表达。Zuo 和 Chua（参见前面）描述了这样一个例子，与植物相关，基于通常无活性的（由于与 Hsp90 结合而隐蔽）嵌合转录因子的表达。在诱导子（一种类固醇激素或者类似物，例如地塞米松）存在下，该转录因子从 Hsp90 释放并可以驱动基因表达。

这种系统的组件是：

- i 启动子—毒素 ORF
- ii 启动子—转录因子 ORF
- iii 转录因子—响应启动子—解毒剂 ORF

适宜地，可以使用绒毡层（tapetum）-专一性 A9 启动子。绒毡层是产生功能性花粉所需要的组织。这样该系统在除了绒毡层之外的所有组织‘关闭了(off)’。在绒毡层中，毒素和转录因子均表达。在诱导子（此处是地塞米松）存在下，解毒剂也表达。因此，用地塞米松处理的植物是正常的，但未用地塞米松处理的植物不产生花粉。

芽孢杆菌 RNA 酶（Barnase）和芽孢杆菌 RNA 酶抑制剂（barstar）（Hartley, RW, 1988, J. Mol. Biol. 202: 913, Hartly, RW, T. I. B. S. 14: 450-454, 1989）适用于分别作为毒素和解毒剂。然而，尽管芽孢杆菌 RNA 酶和芽孢杆菌 RNA 酶抑制剂是毒素/阻遏物对的适宜的例子时，但是本发明不是如此限制的，并且适宜的阻遏物可以在转录（或其

它)水平起作用,并且毒素本身不一定必需是蛋白质。

是致死系统的致死效应是条件性的,并且不单独是致死基因的表达。因此,本发明包括在致死基因表达水平上的条件控制,以及通过控制致死基因产物的活性的条件控制的可能。这样,本发明包括产生了致死基因产物,但其效应以某种方式隐蔽了的情况。

我们优选本发明的方法只使用有单一的条件显性致死遗传系统的生物。此外,我们优选本系统是生物中存在的唯一重组元件。我们特别优选该生物只含有一种致死基因,但是可能设想多重致死基因在同一调节控制之下,只需有整合的遗传构建体概念但该系统有更有效的致死性。这种单一的致死基因可能仅在遗传系统中的仅仅一个启动子或者多于一个启动子的控制下。

本发明的生物优选地是重组体,通常是指任何通过遗传操作改变了其遗传物质的生物。我们优选通过插入来自其它种类的基因、基因片段或遗传元件(诸如启动子或增强子),来修饰该生物以便产生转基因生物。转基因组分通常是产生条件致死效应的致死系统。然而,条件致死效应也可以使用来自同一(宿主)种类的遗传组分产生。例如,来自同一物种的不同基因的启动子,在放到正常在低水平表达的基因前面之后,可能造成致死效应。重组生物因而是转基因生物或其中已经修饰了宿主遗传物质来产生致死系统的。

多细胞生物可以是任何生物,诸如植物或动物。实际上,本发明通常只限于那些在生活周期中有性组成的生物,这样能够使致死系统从一种生物转移到另一个。例如,本发明也可以用于鱼类,诸如海七鳃鳗(sea lamprey),对它已经应用了不育雄性释放技术。我们特别优选本发明的多细胞生物是昆虫,特别优选的是昆虫害虫。一种昆虫害虫可以是直接或间接害虫。直接害虫是在生活周期的一个或多个阶段通过例如吃作物或损害动物造成损失的那些昆虫。例如旋丽蝇(The New World screw-worm fly *Cochliomyia hominivorax*)是牛的直接害虫。间接害虫是那些是人类疾病载体的昆虫,诸如携带疟疾的蚊子。还已知人之外的生物诸如家畜和植物等的间接害虫。

本发明的优选的昆虫靶标包括作物(耕种的和森林的)害虫动物害

虫和疾病载体。潜在地可能用于本发明的特定生物的例子包括，但不限于：铜绿蝇(*Lucilia cuprina*)，白纹伊蚊(*Aedes albopictus*)，日本弧丽蚋(*Propilla Japonica*)，白缝象(*Graphognatus spp.*)，吴刺粉虱(*Aleurocanthus woglumi*)，芒果大实蝇(*Dacus dorsalis*)，橄榄大实蝇(*Dacus oleae*)，热带实蝇(*Dacus cucurbitae*, *Dacus zonatus*)，地中海蜡实蝇(*Ceratitis capitata*)，纳塔耳实蝇(*Ceratitis rosa*)，樱桃绕实蝇(*Rhagoletis cerasi*)，昆士兰芒果实蝇(*Bactrocera tryoni*)，加勒比海实蝇(*Anastrepha suspensa*)，外来火蚁(*Solenopsis richteri*, *Solenopsis invicta*)，舞毒蛾(*Lymantria dispar*)，苹果小卷蛾(*Cydia pomonella*)，黄毒蛾(*Euproctis chrysorrhoea*)，黄热病伊蚊(*Aedes aegypti*)，疟疾按蚊(*Anopheles gambiae*, *Anopheles stephansi*)，旋丽蝇(*Cochliomyia hominivorax*)，蛆症金蝇(*Chrysomya bezziana*)，舌蝇(*Glossina spp*)，墨西哥棉铃象(*Anthonomus grandis*)，束翅亚目昆虫(*Enallagma hageni*)，差翅亚目昆虫(*Libellula luctuosa*)，和三化螟(*Tryporyza incertulas*)。讨论许多上述生物的适用性的综述是：C. Boake 等, (1996) *Annu. Rev. Entomol.* 41: 211-219, J. Meyers 等, (1998) *Annu. Rev. Entomol.* 43: 471-491, C. Calkins 等, (1994) 果蝇和不育昆虫技术 (Fruit flies and the sterile insect technique). CRC Press. ISBN 0849348544, E. Krafsur 等, (1997) *Annu. Rev. Entomol.* 42: 503-523 and R. de Shazo 等, (1994) *J. Allergy Clin. Immunol.* 93(5): 847-850。将会理解，本发明通常可用于所有的能够有性繁殖的多细胞生物，诸如植物和动物。

对所有的动物，转基因的原种在适当的地点和时间释放到环境中。对于植物，成体是不移动的，程序小有差别。或者释放配子本身，例如花粉，或分散植株，例如在田间边缘，为野生杂草传粉并因此降低它们的繁殖能力。本发明特别可用于那些杂草的控制，诸如毒麦 (rye grass)，它们是不能用现有除草剂良好地控制的，或者针对已经产生了除草剂耐受性的杂草种类。

并非所有用于描述，例如，植物的术语都适用于动物或反之亦然。但是，针对一个物种描述的本发明的原理可以通过本领域的熟练技术人

员容易地用于其它物种。例如，对昆虫使用术语“雌性”和“雄性”，在适当时，可以分别指只有可存活的雌性或雄性组织的植物。术语“性别分离”也可以指已经基于它们的可存活的性别组织与其它植物分离的植物。

本发明优选的是致死遗传系统在生物体被释放到的需要生物防治的环境中总会表达，并且不受环境因子中天然变化的影响。这样，使用本发明总能实现生物防治，而不需考虑释放的地点、释放的时间或任何其它环境条件。当控制条件表达的因子是人工的时候，即可清楚地根据定义这种因子不能在天然环境中存在。本发明是普遍性的，意思是它可以普遍地应用到整个国家或世界环境。

实际上，任何天然环境本身即提供了生物的限制性条件，导致生物防治。这样，基于物的释放，保证了限制性条件的存在，而不涉及到局部环境条件会影响致死系统的作用。优选地，该生物的天然环境缺乏控制因子或条件，然后其导致在该环境中表达致死遗传系统。

本发明的多细胞生物优选的在一个或多个位点有纯合的致死系统。在有一个纯合拷贝的致死系统时，则至少一个拷贝的系统会在有性繁殖过程中传递到任何子代。因此，除非在许可条件下，显性致死效应均会发挥作用。可以使用显性致死系统的杂合子实施本发明。但是，在这种情况下，不是所有的子代均含有一个拷贝的致死系统，降低了对种群的作用。

优选地，遗传系统的所有元件出现在相同的染色体上，位置非常接近。这样，很可能致死系统的所有元件传递到下一代。但是，当控制元件存在于与致死基因不同的遗传位点时，致死系统也可以发挥功能，例如，如果这些元件的控制效应以反式起作用。这时，如果控制和致死元件是纯合的，并且它们的至少一个拷贝转移到子代遗传系统仍然有效。

一方面，本发明涉及非性别-专一性系统，此时致死遗传系统杀死雄性和雌性。对有些生物，这种方法是优选的。这种情况下，本发明的一个优点是可以避免通过放射进行绝育。举例说明，对红铃虫（pink bollworm）（棉花的一种鳞翅目害虫）优选的是混合性别释放，但是，估计辐射的蛾由于辐射损失活力和减少生存时间效率至少有 10 倍的降低。

在其它生物中预计有类似的优点。在地中海果蝇中，竞争交配测试中，辐射的雄性比未辐射的等价物效率低大约 50%并且它们的生命是 3-5 天而不是未辐射的 10-15 天。这样通过避免辐射给出了共 4-10 倍的可能的效果改进。

备选地，本发明的方法利用性别-专一性致死系统在将生物释放到环境中之前或之后进行性别分离。在一个优选实施方案中，多细胞生物是含有纯合显性致死系统的昆虫，该致死效应仅致死雌性。在这一实施方案中，释放到环境中的雄性不会被杀死。与雌性交配之后，雌性后代至少会含有一个拷贝的致死系统而被杀死。但是，雄性后代，50%含有显性系统，是能存活的并可与另外的雌性交配。以这种方法，显性系统可以传递到下面的各代，虽然没有进一步的人工引入，该系统最终会从基因库中丢失。

在雄性含有具有雌性专一性致死效应的致死遗传系统的情况下，不会杀死释放到环境中的雄性。但是，致死系统的致死效应仍然在天然环境中出现-虽然这种效应仅限于雌性。

可以通过许多不同方法实现性别-专一性致死。例如，可能使用性别-专一性致死基因作为致死系统的一部分，它的基因产物仅对一种性别有毒性。即使基因产物的致死基因的表达是非性别专一性的，这种方法仍然可以杀死一种性别。雌性性别-专一性致死基因的候选物包括来自性别决定途径的基因，例如通常仅在雄性中有活性而在雌性中有毒性，或来自性别分化或配子形成系统的基因。

另外备选地，致死基因的表达或基因产物可以被控制，从而它只在一种性别中（或仅在雌雄同体的一种配子或性器官中）表达或产生。例如，可以使用性别-专一性启动子或增强子，其或者与性别-专一性致死基因或者与非-专一性致死基因组合。性别-专一性拼接提供了性别-专一性基因表达的另一种模式。本发明考虑了非专一性致死基因、性别-专一性致死基因、非专一性启动子和性别-专一性启动子的所有可能的组合。此外，本发明包括了控制致死基因的致死效应的其它性别-专一性因子。

本发明还包括了一种生物防治的方法，其中致死效应在生活周期的一个阶段是性别-专一性的，但是在另一个阶段是对两种性别均致死。例

如，在成体生物中，该致死系统可能是雌性专一性的，但是在幼虫阶段，对雄性和雌性均致死。在这种情况下，通过在成体形式中的致死系统的表达可以杀死一种性别。当随后在野生环境繁殖时，传递遗传构建体，则同时可以杀死雄性和雌性。这种效应例如可以通过在生活周期的一个阶段是性别专一性的，而在另一个阶段不是性别专一性的启动子，或者将致死基因置于两种不同的启动子控制下来实现。还可能使用多重致死系统。

例如，在胚或幼虫阶段出现的致死效应不会影响成体生物，如果它们在这一阶段生长在许可条件下的话。这样，可以在致死生活周期阶段之后，将生物释放到环境中，使致死系统通过有性繁殖传递到野生型种群。如果适当，也可以通过选择在特定生活周期阶段表达的基因或启动子来靶向其它的生活周期阶段，诸如成体阶段。

我们优选本发明的多细胞生物体在多于一个位点有一个拷贝的致死遗传系统。优选地，致死系统在多于一个位点（locus）是纯合的。

多拷贝的致死系统可用于增强本发明的效应。例如，对于雌性专一性致死系统，如果该生物体在一个位点是纯合的，任何从这种生物体与野生型雌性交配产生的雌性均会被杀死。雄性子代会存活，并携带一个拷贝的该系统。下一代（第二代）中只有 50% 雄性子代携带致死系统。

如果大于 50% 的这种下一代（第二代）雄性子代能够遗传该致死遗传系统，则本方法明显的将会更加有效。有多种方法可以达到此目的。例如，如果致死遗传系统在多于一个位点是纯合的，这些位点不是紧密连锁的，例如多于一个染色体，则这些雄性携带致死遗传系统的比例将会增加。具体地，当致死遗传系统在两个非连锁位点是纯合的，第一代雄性在两个位点将均为杂合的，75% 的第二代雄性将携带至少一个拷贝的致死遗传系统。相应的，在限制条件下，所有的第一代和 75% 的第二代雌性将会死亡。

获得这种效应的另一种方法是使用分离畸变/减数分裂驱动系统（segregation distortion/meiotic drive system）。在果蝇 SD 系统中，SD 染色体优选地遗传自杂合 SD 和正常（+）SD-敏感染色体的雄性。SD/+ 雄性传递 SD-携带（SD bearing）至实际上已排除+-携带，同系物；多

于 99%的功能性精子可能携带 SD。已知在宽广范围的昆虫和非昆虫种类中含有分离畸变/减数分裂驱动系统。

保证在第二代中>50%的遗传有致死遗传系统的第三种方法是将致死遗传系统连接到杀虫剂抗性并使用杀虫剂消除某些或全部不携带致死遗传系统从而不携带连接的抗性基因的第二代（及其后的）子代。

致死系统可以位于任何染色体上，常染色体或性染色体均可。当物种的性别由 X 或 Y 染色体含量决定并且需要从基因库中消除转基因时，我们优选致死系统位于 X 染色体。考虑到致死系统对雌性专一的情况。在 X 染色体上有致死系统的雄性生物（XY）在野外与雌性野生型生物（XX）交配。雄性后代的 Y 染色体必须来自重组雄性而它们的 X 染色体来自母本。这些雄性是有存活力的并且不含致死基因。雌性后代的一个 X 染色体必须来自重组雄性并因此含有致死遗传系统-它们被杀死。这样，从基因库中消除了致死系统，如果这种元件是转基因，则这种消除可能是优选的。

本技术还提供了自身选择雄性或雌性的方法，包括产生此处描述的含有条件显性致死系统的生物，其中的致死系统的致死效应是性别-专一性的。性别选择是通过表达致死系统的致死效应，以消除一种性别来实现的。然后，可以将单独的雄性或雌性种群用于任何所需的目的，而不仅限于生物防治。

本发明还涉及产生用于本发明的重组多细胞生物的方法，其中的生物用含有显性致死系统或定点突变的适当序列的一个或者多个载体来转化。

本发明进一步涉及含有此处描述的显性致死系统的一个或者多个载体。

我们优选所有控制显性致死基因的表达所需要的元件位于单一转化构建体（载体）。这样，只需一次转化步骤和单一转化标记。另外，使用单一转化构建体有助于防止致死遗传系统的各分离的元件的重组。因此，优选的是含有本发明的任何条件显性致死遗传系统的单一载体。

进一步优选的是含有本发明的条件显性致死遗传系统的载体，其中载体的组件（诸如基因或调节元件，特别是致死基因）是彼此遗传上隔

离的。优选的，在载体的致死遗传系统的不同元件之间没有顺式相互干扰。优选的载体中，致死遗传系统的组件彼此通过隔离序列分开，该隔离序列来自脊椎动物 DNA，防止这种相互干扰。有报道这类隔离物在果蝇中有作用，例如[Namciu, S. J., *et al.*, (1998) Mol. Cell. Biol. 18: 2382-91 and Chung, JH., *et al.*, (1993) Cell 74: 505-514]，并且可能至少可以扩展到在其它昆虫物种中有效。

在一个优选实施方案中，本发明的载体含有四环素阻遏系统。优选地，致死基因位于这一系统的同一 DNA 序列或载体，任选地还有一个报告基因。适宜的基于四环素的致死系统包括两种关键组件，一种致死基因和一种激活致死基因表达的 tTA 基因。四环素或者其类似物然后通过 tTA 阻断致死基因的激活。这种情况下，我们优选使用增强子-阻断的隔离子从下一个组件中分离出一种组件，即从 tTA 分离出致死基因，从报告基因分离出致死基因以及从报告基因分离出 tTA 基因。

在此处的实施例 7 中给出了其中分隔了遗传元件的特别优选的载体及模块。这种载体含有显性致死四环素-阻遏(repressible)遗传系统，其中该系统的至少某些遗传组件是由遗传隔离子序列分隔的。致死基因是来自果蝇的 Nipp 基因。

可以通过使用任何合适的启动子取代 BmA³ 启动子改造此模块化载体，使构建体可用于任何感兴趣的生物。这样，本发明提供了此处描述的模块化模板载体，其中 BmA³ 启动子组件可以用任何启动子取代，以用于任何合适的生物。

本发明还扩展到这种特定的模块化载体的变体，其中的功能元件已经用其它行使等价的功能的元件取代，诸如其它的隔绝子或致死基因，还扩展到编码这类变体的 DNA。

本发明还涉及构建一种载体的方法，该载体适于将显性致死遗传系统给予一种生物，包括下列步骤：

- i 至少提供一种条件致死遗传系统；
- ii 选择一种适于在生物体中表达该系统的启动子；并且
- iii 连接该启动子和条件致死遗传系统，任选地加上其它组件，来产生适用于转化的功能性载体；

其中将该载体转化到生物体产生本发明的用于生物防治的生物体。

优选地，载体的致死遗传系统是模块化的(modular)，其中的组件可以单独用功能等价的遗传组件取代，使致死系统适于在感兴趣的生物中行使功能。例如，这种模块化载体使致死基因或启动子序列可以被取代，例如不需要产生完全新的载体。适宜地，可以使用隔离子序列隔离各遗传组件而它们仍然一起起作用造成致死效应。优选地，载体至少包含一个隔离子(insulator)序列，优选的含有两个这类序列。

本发明还涉及使用上述方法获得的载体以及可以使用上述方法获得的载体。

本发明还扩展到编码本发明的条件显性致死遗传系统的多核苷酸，优选的是 DNA 序列。特别地，本发明涉及编码实施例的致死遗传系统的 DNA，特别是此处的实施例 7 的模块化转化载体，以及涉及具有诸如取代、缺失或插入等微小变化的这类 DNA 的突变体和变体，但其中的载体或致死遗传系统的功能基本不受影响，并且载体能够造成所需的本发明的致死效应。

另外备选地，如果需要，可以使用多重载体转化致死系统的必需元件到生物体。用于控制的控制元件和增强子，例如作用于致死基因的转录因子，本身也可能干涉致死基因的表达。因此，可能需要使用沉默子(silencer)元件或其它遗传隔离元件分隔各组件，以避免不期望的基因表达问题。

启动子或增强子对基因的作用通常需要这些元件处于同一段 DNA。但是，一种转录因子的作用可能是反式发挥的，并且可以位于，例如不同的染色体。本发明不限于将这些控制元件整合到同一染色体上。

构建重组多细胞生物可能需要使用靶物种（要控制的物种）的转化系统。转化系统的特定性质不是本发明的关键特征，并且已知多种，例如，昆虫的转化方法。

可以使用标准的分子生物学技术在细菌诸如大肠杆菌中构建载体。我们优选用于转化的载体含有选择性标记，诸如产生 G418 抗性或潮霉素抗性的基因。另外，也可以使用除了涉及抗生素抗性特征的那些之外的备选的基因，诸如绿色荧光蛋白 (GFP)。在适当的启动子控制下表达，

这种蛋白质可以简单的通过适当的激发波长（例如蓝色光）辐射并观察荧光而进行观察。这种标记也使释放和回收实验(release-and-recapture)中对捕捉的昆虫的鉴定容易。

本技术领域熟练人员对其它适当的转化标记是熟知的。

本发明还扩展到使用本发明的载体转化的细胞，诸如细菌细胞。本领域熟练人员熟知，例如这类保持和/或增殖这种载体的适当的细胞系。

我们优选的是，从生物中缺失本发明的所有或部分致死遗传系统后在许可条件下对含有该系统的生物没有选择性优势。在品系稳定性方面，使用此处描述的致死遗传系统有显著优势。一般而言，交叉运用相关的转座子和/或其它未知机制可能意味着转座子插入不如“真正的”基因稳定。在以生物防治中可能需要的十亿/星期的水平养殖时，甚至极端稀少的事件也会重复出现。这是目前的地中海果蝇雌雄分离品种的主要问题，其中它们依赖的染色体转座损坏了（以低频率出现）。不幸的是，产生的蝇比其它的原种有显著高的适宜性，并且因此它们的数量趋向于快速增长。但是，在本发明中，破坏的产物（缺失所有或部分转座子）在含有Tc的培养基中培育时，与所需的原种相比没有巨大的优势。此外，当存在多重插入时，需要发生多个独立事件（即失去各个插入物）才能使该原种完全失效。

如果需要，可以进一步稳定致死基因复合体。适宜的方法包括在整合后删除转座子的一个末端或者使用定位重组系统诸如 FRT/Flp 或 cre/lox 将系统从转座子第二次移动到另一个位点。这两种系统已知在果蝇中有效。

现在将参照下列实施例举例说明本发明，其只是为了举例说明的目的，而不是限制本发明，其中：

图 1 图示用于生物转化的模块化载体；

图 2 图示本发明的减数分裂驱动系统的模型；

图 3 图示使用多重非连锁基因座(loci)进行种群控制的模型；

图 4 图示根据本发明的减数分裂驱动系统的模型；

图 5 图示使用多重非连锁基因座(loci)进行种群控制的模型；

图 6 图示本发明的另一种减数分裂驱动系统的模型；

图 7 图示使用多重非连锁基因座(loci)进行种群控制的模型；以及图 8 图示使用图 2, 6 和 7 的参数进行种群控制的模型，但其中的头两个释放在数目上倍增。

实施例：果蝇模型中的生物防治

简介

在一个特定实施方案中，可能使用两-部分系统产生条件致死效应。这种系统基于大肠杆菌的转座子-1-衍生的四环素(Tc)抗性操纵子的阻遏物(tetR)。使用这种阻遏物在真核生物中进行可阻遏基因表达是由 Manfred 和 Hermann Bujard 发展的(综述于 Gossen, *et al.*, TIBS 18 471-475 1993)。在这种系统中，tetR 基因产物融合到 VP16 的酸性结构域，来产生高效的 Tc-可阻遏的反式激活蛋白(tTA)。

该系统的第一部分是在适当的启动子控制下表达的 tTA，第二部分是在 tTA 控制下表达的显性致死基因。总的来说，这样给出了 Tc-阻遏模式的显性致死的表达。当得不到四环素时，tTA 激活致死基因。当存在四环素时，它与 tTA 结合并阻止 tTA 激活致死基因。这种致死系统处于选择的启动子控制之下。更进一步水平的控制是通过选择使用何种 Tc-类似物进行阻遏：不同的类似物在昆虫中有不同的半寿期，导致致死基因在去掉饮食中的阻遏物之后或快或慢的诱导。

我们优选使用非杀菌剂类似物，从而不会造成环境中微生物的四环素抗性。使用非杀菌剂类似物对诸如舌蝇(tsetse fly)等物种在任何情况下都是必要的，因为它们有抗生素要杀死的昆虫的繁殖所必需的共生细菌。

甚至这种单一的系统也可以变化以便提供用于种群控制的灵活的工具。更大的灵活性可能通过组合两种或多种启动子或增强子获得。例如，地中海果蝇的控制可以使用成体雌性中表达(防止产卵的雌性的释放)，以及在早期胚发育期表达(防止幼虫在果实中的生长)。由于这意味着在胚开始为自己摄食之前表达，使用相对稳定的 Tc 类似物饲养该原种是重要的，这样由于母代对 Tc 的贡献可以使胚存活。也可以使用幼虫表达作为备选的方案，但对果实损害更大。

使用上述系统控制致死基因的致死效应仅是为了说明怎样获得该效应的一个例子，例如，还可以使用可以获得所需的效应的多种启动子、反式激活蛋白和致死基因。

在上述方案中，可能需要在多于一个阶段表达。这可以通过使用两种单独的 tTA 构建体获得，或者将阶段-专一性增强子组合到一个构建体来实现。可以通过扣除杂交方法或其它已知方法鉴定阶段-专一性表达的适当的启动子。

可以在任何适当的点将致死基因或系统插入到转基因生物的染色体。不必要确定致死基因在染色体上的位置。虽然插入的元件可能对邻近的染色质上控制元件有反应，但是，这不是 tRE-杀死 (tRE-killer) 种系的问题，其中不适当表达的种系可能不会存活。

已经在模式昆虫品种黑尾果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 中举例说明了本发明。虽然黑尾果蝇不是一种经济上重要的害虫，但它易于实验处理。已经证实了果蝇中的一般的 tTA 系统 (Bello, B., et al., 1998, *Development* 125: 2193-2202)。下面使用的 Hsp26-tTA 和 tRE-lacZ, 以及一些载体[见下述], 来自这篇文章。

组成:

反式激活蛋白组分 (启动子-tTA)

Hsp26-tTA: 热激蛋白 26-tTA。低本底水平, 热激诱导至高水平, 非性别-专一性。

获自 Bruno Bello (NIMR, London)。详见 Bello *et al.* (1998) *Development* 125, 2193-2202。将含有部分翻译区的 Hsp26 启动子区 (序列-1917 至+490) 融合到以 EcoRI/BamHI 片段从 pUHD15-1.neo 分离的 tTa 编码区, 随后是 Hsp70 基因的转录终止序列。

Act5C-tTA: 肌动蛋白 5C-tTA。强, 组成型, 普遍存在的启动子, 非性别-专一性。

tTA 编码区以 EcoRI/PvuII 片段切下, 然后使用 T4 DNA 多聚酶补平末端。使用 XbaI/BamHI 消化 p CaSpeR {肌动蛋白 5C GFP} (Reichhart and Ferrandon, (1998), *D. I. S.* 81: 201-202) 以除去 GFP 片段, 然后使用

T4 聚合酶补平末端。然后，将这两种片段连接。使用 *SamI*/*EcoRV* 消化筛选产生的克隆，以选择有正确取向的克隆，将 *tTa* 编码区域置于肌动蛋白 5C 启动子控制之下。

Stw1-tTA: *Stonewall-tTA*。在胚中是雌性-专一性的，但其后在两种性别中均表达。

通过 *EcoRI* 和 *PvuII* 消化从质粒 *pUHD-15-1.neo* 中切下 *tTa* 编码区。然后，将这一片段连接到用 *EcoRI*/*PvuII* 消化的质粒 *pstw1^{tmCa}* (Clark, K.A. and McKearin D.M. (1996), *Development* 122(3): 937-950)，从而将 *tTa* 置于 1.7 kb 的 *stw1* 启动子基因组 DNA 的转录控制之下。

Sxl^{pe}-tTA: 性别致死-*tTA*。来自 *Sxl* 的早期启动子 (PE)。认为仅在早期雌性胚中表达。

通过 *EcoRI* 和 *PvuII* 消化从质粒 *pUHD-15-1.neo* (Gossen M. and Bujard H. (1992); *PNAS*, 89, 5547-51) 中切下 *tTa* 编码区。然后将这一片段连接到用 *EcoRI* 和 *EcoRV* 消化的 5-1 *sxl^{pe}: bluescript* (含有 *Sxl^{pe}* 序列 (Keyes LN, et al. (1992) *Cell*. 6; 68(5): 933-43) 以产生 *sxlpe tTa bluescript*。将含有 *tTa* 编码区和 *sxlpe* 启动子的 *KpnI/NotI* 片段亚克隆到用 *KpnI/NotI* 消化的 P 元件转化载体 *pP{W8}* (Klemenz *et al.*, (1987) *Nucleic Acids Res.* 15: 3947-3959) 以产生 *p(sxl^{pe}tTa)*。

Yp3-tTA: *Yolk 蛋白质 3-tTA*。来自卵黄 (*yolk*) 蛋白质 3 的雌性脂肪体增强子 (FBE)，含有 *hsp70* 最小启动子。在幼虫和成体雌性脂肪体中表达。

从 *EcoRI* 和 *PvuII* 消化的 *pUHD15-1.neo* 质粒切下 *tTa* 编码区。将这一片段克隆到 *yp3* 表达构建体 *pFBE* (Bownes M, personal communication) 的 *EcoRI/PvuII* 位点，使其处于雌性脂肪体增强子 (FBE) (Ronaldson E, et al. *Genet Res.* 1995 Aug; 66(1): 9-17.) 和最小 viral 启动子转录控制之下。

tRE-响应基因

tRe-lacZ: 大肠杆菌 *lacZ* 基因，编码 β -半乳糖苷酶。用作报告蛋白。获自 Bruno Bello (NIMR, London)。详见 Bello et al. (1998) *Development* 125, 2193-2202。以 *EcoRI/KpnI* 片段形式从 *pUHC 13-3* (Gossen M. and

Bujard H. (1992); PNAS, 89, 5547-51) 分离七个重复的 tet 操纵子并克隆到增强子-检测载体 CPLZ (Wharton KA and Crews ST. (1994) Development. 120 (12): 3563-9.) 的 P-lacZ 融合蛋白的上游。CPLZ 含有 P 元件转座酶启动子 (从 cap 位点向上至-42) 和 N-末端转座酶序列, 其与 lacZ 以及 SV40 的多聚腺苷酸信号符合读框地融合。

WTP-2 (white-tetO-P 启动子-载体, 含有 tRe 序列)

获自 Bruno Bello (NIMR, London)。详见 (Bello *et al.* (1998) Development. 125: 2193-2202)。构建这种 P-元件载体是为了表达处于四环素-响应启动子控制下的任何基因。它含有 CPLZ 的载体骨架、tet 操纵子的 7 个重复、P-元件启动子、来自 Carnegie 4 (Rubin GM and Spradling AC (1983) Nucleic Acids Res Sep 24; 11(18): 6341-51) 的前导序列以及 SV40 的多聚腺苷酸信号。

WTP-3 (修饰的 WTP-2)

通过向 WTP-2 MCS 添加两个互补寡核苷酸 5' UAS ATG+ (AATTGCCACCATGGCTCATATGGAATTCAGATCTG) 和 3' UAS ATG- (GGCCGCAGATCTGAATTCCATATGAGCCATGGTGGGC) 修饰 WTP-2 载体。将寡核苷酸与 EcoRI/NotI 消化的 WTP-2 退火并连接。这种寡核苷酸将同义翻译起始点和多个其它的克隆位点引入到 WTP-2 的多克隆位点 (MCS)。

tRe-EGFP。编码绿色荧光蛋白 (GFP) 的突变体, 一种编码荧光蛋白的水母 (Aequoria) 基因。EGFP 突变体有两个氨基酸变化, 表达更亮的, 更可溶的蛋白。用作报告蛋白。从 pP{UAS-EGFP} 载体以 NcoI/EcoRI 片段的形式分离增强的绿色荧光蛋白 (EGFP, GFP 的 F64L, S65T 衍生物) 编码区域 (Craven *et al.* (1998) Gene 9; 221(1): 59-68), 然后用 T4 聚合酶补平末端。如下构建 pP{UAS-EGFP}。pP{UAS-EGFP}。

为了能够在多克隆位点使用 *NdeI*, 通过消化、末端补平和重新连接消除了 pP{UAST} 的单一 *NdeI* 位点。然后, 我们使用两个寡核苷酸 (UAS-ATG+= 5' AATTGCCACCATGGCTCATATGGAATTCAGATCTGC 和 UAS-ATG-=5' GGCCGCAGATCTGAATTCCATATGAGCCATGGTGGC), 将它们退火并连接到 *EcoRI-NotI* 消化的 pP{UAST} (已经消除了 *NdeI* 位点) 制成 pP{UAS-LP}。我们使用 *pfu* 聚合酶和寡核苷酸 5' TAGGAGTAAAGGAGAAGAAC 以及 5'

AATTCATATGTTTGTATAGTTCA 扩增了来自 pGEM-T-EGFP [Craven, 1998, 见前面]的插入物。将各个 PCR 产物凝胶纯化然后在含有 dGTP 和 dCTP 但不含有 dATP 或 dTTP 的情况下与 T4 DNA 聚合酶温育。这样在片段的一端制造出 *NdeI*-兼容的粘性末端并在另一端制造出 *EcoRI*-兼容的粘性末端。随后将这些片段亚克隆到 *NdeI*-*EcoRI* 消化的 pP {UAS-LP} pP {UAS-EGFP}。

然后, 将 WTP-3 载体用 *EcoRI* 消化并用 T4 聚合酶补平末端并将片段连接到一起。然后使用 *PvuII*/*BamHI* 进行诊断性消化, 选择正确取向的克隆。

tRe-Ras64B^{v12}。黑尾果蝇的 Ras64B 突变体, 参与细胞信号传导。突变体是有组成性活性的, 如果表达量足够高会对细胞有毒性。毒性是非性别-专一性的。Ras64B^{v12} cDNA 从 p {sevRas64B^{v12}} (Matsu et al., (1997), Development 124(14): 2671-2680) 以 *EcoRI*/*NotI* 片段的形式克隆到用 *EcoRI*/*NotI* 消化的 WTP-2。

tRe-Msl-1^{Mpu}。黑尾果蝇的 Msl-1 的突变体。Msl-1 是性别决定途径的组分, 通常仅在雄性中表达, 在雌性中被性别致死基因产物抑制。突变体的活性与性别致死无关, 使得它在足够高水平表达时对雌性有毒。毒性因此时性别-专一性的。将 msl-1^{Mpu} cDNA 从 M1-ECTOPIC (Chang and Kuroda, (1998) Genetics 150(2): 699-709) 以 *EcoRI* 片段的形式克隆到用 *EcoRI* 消化的 WTP-2 载体。然后使用 *HindIII*/*NotI* 诊断消化, 以筛选正确方向的克隆, 将 Msl-1^{Mpu} cDNA 置于 tRe 序列控制之下。

tRe-Msl-2^{Nopu}。黑尾果蝇的 Msl-2 的突变体。Msl-2 是性别决定途径的另一个组分, 通常仅在雄性中表达, 在雌性中被性别致死基因产物抑制。突变体的活性与性别致死无关, 使得它在足够高水平表达时对雌性有毒。毒性因此时性别-专一性的。将 msl-2 cDNA 从 pM2 NOPU (Kelly et al., (1995), Cell 81; 867-877) 以 *NotI*/*XbaI* 片段的形式克隆并且克隆到用 *NotI*/*XbaI* 消化的 WTP-2 载体。

实施例 1: 单染色体杂交

在 25°C 下的“单染色体杂交(single chromosome crosses)”中, 10-15 只 tTA 构建体纯合的原始 (virgin) 雌性和 5-10 只 tRe 构建体纯合的

年轻的雄性置于含有或缺乏四环素添加剂的食物中。它们的后代将依赖这种食物生长发育。

Sxl^{pe}

四环素浓度：微克/毫升	雌性	总数	雄性	总数
0	0 ^A , 0 ^B , 0 ^C , 0 ^F , 0, 0, 0, 0	0	58, 47, 60, 51, 46, 60, 52, 54	428
0.1	46, 49, 50, 51, 52, 50, 41, 40	379	56, 42, 72, 41, 56, 72, 61, 34	434
1	52, 40, 60, 0, 60, 72, 50, 52	386	50, 51, 55, 3, 63, 54, 57, 56	389
5	41, 55, 49, 52, 48, 47, 40, 51	383	36, 47, 42, 55, 36, 55, 52, 52	375

Sxl^{pe} tTa^(A, B, C, F) x tRe Ras64B^{V12(B, C)}

数据形式 (format): 8 个数字是使用各元件 (用以控制位置效应) 的独立的插入物的杂交结果。此处, 使用了 4 个插入物 Sxl^{pe}-tTA (A, B, C, 和 F) 以及两个 tRE-Ras64B^{V12} (B 和 C)。数据的顺序是: Sxl^{pe}-tTA^(A) 雌性和 tRe-Ras64B^{V12(B)} 雄性, 然后是 SxlB x RasB, SxlC x RasB, SxlF x RasB, SxlA x RasC, SxlB x RasC, SxlC x RasC 以及最后是 SxlF x RasC。其它表中的数据有类似的形式。

四环素浓度：微克/毫升	雌性	总数	雄性	总数
0	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0	0	59, 57, 62, 51, 73, 69, 57, 55	483
0.1	61, 52, 47, 46, 22, 31, 36, 15	296	60, 62, 56, 71, 69, 75, 55, 72	520
1	59, 57, 63, 59, 31, 21, 15, 21	326	47, 56, 49, 62, 63, 67, 71, 58	473
5	61, 47, 52, 56, 38, 22, 16, 12	304	68, 72, 67, 92, 58, 54, 61, 63	535

$$Sxlpe\ tTa^{(A, B, C, F)} \times tReMsl-1^{Mpu(A, B)}$$

$$\text{Sxlpe tTa}^{(A, B, C, F)} \times \text{tRe Msl-2}^{\text{Nopu}(B, C, D)}$$
$$\text{Stw1 } t\text{Ta}^{(A, B, C)} \times t\text{ReRas64B}^{V12(B, C)}$$

四环素浓度：微克/毫升	雌性	总数	雄性	总数
0	0, 0, 0, 0, 0, 0	0	50, 44, 45, 56, 40, 67	302
0.1	67, 56, 37, 23, 16, 12	211	56, 53, 50, 61, 42, 74	336
1	69, 64, 41, 13, 31, 18	236	33, 70, 39, 45, 40, 70	257
5	52, 42, 49, 19, 20, 41	223	37, 80, 41, 48, 80	291

Stw1 tTa^(A, B, C) x tReMsl-1^{Mpu(A, B)}

四环素浓度：微克/毫升	雌性	总数	雄性	总数
0	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0	0	38, 53, 47, 68, 38, 70, 52, 60, 55	481
0.1	54, 57, 41, 64, 40, 63, 39, 42, 36	436	59, 58, 49, 73, 48, 69, 45, 47, 43	491
1	46, 34, 35, 63, 47, 70, 64, 39, 41	439	55, 40, 40, 71, 50, 72, 74, 46, 42	490
5	52, 70, 37, 34, 35, 57, 49, 50, 50	434	54, 71, 41, 42, 41, 66, 56, 55, 55	481

Stw1 tTa^(A, B, C) x tReMsl-2^{Nopu(B, C, D)}

肌动蛋白 5C

四环素浓度：微克/毫升	雌性	总数	雄性	总数
0	0, 0, 0, 0, 0, 0	0	0, 0, 0, 0, 0, 0	377
0.1	77, 57, 69, 50, 45, 63	361	50, 70, 71, 67, 53, 61	372
1	86, 59, 60, 80, 70, 72	427	46, 89, 72, 45, 76, 55	383
5	46, 49, 87, 63, 59, 71	375	75, 83, 58, 83, 72, 82	400

Actin5C tTa^(B, C, E) x tReRas64B^{V12(B, C)}

四环素浓度：微克/毫升	雌性	总数	雄性	总数
0	0, 0, 0, 0, 0, 0	0	83, 73, 65, 69, 53, 80	423
0.1	72, 74, 80, 68, 72, 46	412	82, 52, 57, 66, 86, 59	402
1	61, 83, 48, 66, 65, 57	321	74, 69, 85, 58, 48, 61	351
5	70, 57, 50, 62, 61, 86	386	48, 68, 52, 62, 84, 87	401

Actin5C tTa^(B, C, E) x tReMsl-1^{Mpu(A, B)}

四环素浓度：微克/毫升	雌性	总数	雄性	总数
0	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0	0	63, 52, 67, 71, 88, 55, 46, 86, 75	603
0.1	84, 85, 83, 73, 48, 46, 71, 58	548	62, 54, 48, 81, 85, 74, 78, 77, 78	637
1	70, 70, 66, 81, 50, 52, 69, 81, 51	590	69, 87, 47, 64, 66, 59, 58, 47, 52	549
5	67, 70, 87, 61, 54, 54, 67, 74, 81	615	71, 61, 57, 53, 51, 65, 45, 68, 51	522

Actin5C tTa^(B, C, E) x tReMsl-2^{Nopu(B, C, D)}

Hsp26

四环素浓度：微克/毫升	雌性	总数	雄性	总数
0	0, 0, 0, 0	0	0, 0, 0, 0	0
0.1	47, 56, 71, 61	235	46, 52, 53, 59	210
1	60, 46, 52, 41	199	79, 71, 68, 56	274
5	2, 51, 71, 32	156	0, 49, 62, 43	154

Hsp26 tTa^(A) x tRe Ras64B^{V12(B, C,)}

四环素浓度：微克/毫升	雌性	总数	雄性	总数
0	0, 0, 0, 0, 0, 0	0	64, 58, 33, 66, 55, 42	318
0.1	45, 44, 72, 56, 62, 49	328	53, 54, 80, 57, 66, 58	368
1	70, 35, 61, 50, 57, 37	310	78, 36, 70, 56, 61, 42	343
5	44, 58, 58, 59, 42, 52	313	46, 68, 66, 64, 48, 55	347

Hsp26 tTa^(A) x tRe Msl-1^{Mpu(A, B,)}

四环素浓度：微克/毫升	雌性	总数	雄性	总数
0	0, 0, 0	0	56, 47, 56	159
0.1	48, 49, 62	159	56, 68, 49	159
1	43, 45, 51	135	36, 39, 47	122
5	55, 3, 66	124	61, 5, 54	120

Hsp26 tTa^(A) x tRe Msl-2^{Nopu(A, B,)}

Yp3

四环素浓度：微克/毫升	雌性	总数	雄性	总数
0	0, 0, 0, 0, 0, 0	0	65, 70, 61, 65, 47, 42	350
0.1	33, 54, 50, 72, 63, 50	322	42, 64, 52, 74, 67, 54	352
1	56, 56, 61, 69, 57, 43	342	59, 64, 65, 75, 64, 49	376
5	46, 51, 73, 65, 42, 39	316	44, 56, 79, 74, 52, 49	354

Yp3 tTa^(A) x tRe Ras64B^{V12(B,C,)}

四环素浓度：微克/毫升	雌性	总数	雄性	总数
0	0, 0, 2, 0, 0, 0	2	49, 58, 39, 65, 35, 51	297
0.1	36, 65, 71, 37, 59, 68	336	46, 73, 77, 46, 66, 71	379
1	42, 65, 67, 57, 35, 53	319	49, 72, 68, 59, 41, 58	347
5	55, 55, 43, 58, 36, 60	307	63, 64, 49, 63, 45, 64	348

Yp3 tTa^(A) x tRe Msl-1^{Mpu(A,B,)}

四环素浓度：微克/毫升	雌性	总数	雄性	总数
0	0, 0, 0, 0, 0, 0	0	35, 35, 72, 52, 45, 37	276
0.1	34, 68, 42, 51, 33, 40	268	35, 72, 45, 56, 36, 44	248
1	41, 39, 42, 60, 70, 72	324	51, 49, 46, 61, 78, 77	362
5	70, 55, 56, 65, 43, 61	349	74, 58, 64, 73, 51, 66	386

Yp3 tTa^(A) x tRe Msl-2^{Nopu(A, B,)}

结论

这些数据表明一种或两种性别可以被消除，而这种致死性可以通过向食物中添加适当浓度的四环素实现良好的阻遏。这种阻遏在宽广范围的四环素浓度内是有效的。

实施例 2：报告蛋白杂交

在 25°C “报告蛋白杂交(reporter crosses)” 中，在 X 染色体上携带 Sxlp^etTa (Sxlp^etTa^(A)) 插入的纯合的雌性与携带不同的报告基因构建体的雄性杂交。如同“单染色体杂交”一样，10-15 只 tTA 构建体纯合的原始(virgin)雌性和 5-10 只 tRe 构建体纯合的年轻雄性置于含有或缺乏四环素添加剂的食物中。它们的后代将依赖这种食物生长。

LacZ

使用标准的组织化学方法将胚进行 lacZ 的染色。

四环素浓度：微克/毫升	LacZ 阳性	总计	LacZ 阴性	总计
0	60, 85, 99, 60	304	78, 89, 85, 93	345
0.1	0, 0, 0, 0	0	176, 174, 178, 181	709
1	0, 0, 0, 0	0	188, 190, 181, 180	739
5	0, 0, 0, 0	0	156, 151, 159, 185	651

(雌性) Sxlp^etTa^(A) x tRe lacZ^(III) (雄性)

四环素浓度：微克/毫升	LacZ 阳性	总计	LacZ 阴性	总计
0	57, 82, 97, 45	281	61, 74, 59, 82	276
0.1	0, 0, 0, 0	0	131, 165, 132, 90	518
1	0, 0, 0, 0	0	170, 161, 181, 195	707
5	0, 0, 0, 0	0	126, 190, 190, 196	702

(雄性) Sxlp^etTa^(A) x tRe lacZ^(III) (雌性)

四环素浓度：微克/毫升	LacZ 阳性	总计	LacZ 阴性	总计
0	0, 0, 0, 0	0	189, 200, 153, 169	711
0.1	0, 0, 0, 0	0	164, 175, 190, 179	708
1	0, 0, 0, 0	0	182, 190, 195, 167	737
5	0, 0, 0, 0	0	199, 151, 169, 164	683

(雄性) Sxlp^etTa^(A) x tRe lacZ^(I) x C(1)DX (雌性)

EGFP

给胚的荧光记数。对于在没有四环素的培养基上的胚的情况，这些是分开的，允许在没有四环素的培养基中发育并且将出现的成体的性别记数。

四环素浓度：微克/毫升	荧光	雌性	雄性	无荧光	雌性	雄性
0	89, 100, 53, 55	200	0	99, 86, 46, 51	0	232
0.1	0, 0, 0, 0	-	-	199, 182, 188, 153	-	-
1	0, 0, 0, 0	-	-	170, 135, 163, 196	-	-
5	0, 0, 0, 0	-	-	186, 159, 127, 200	-	-

(雌性) Sxlp^e tTa^(A) x tRe EGFP^(II) (雄性)

四环素浓度： 微克/毫升	荧光	雌 性	雄 性	无荧光	雌 性	雄 性
0	60, 91, 62, 83	243	0	102, 56, 79, 72	1	256
0.1	0, 0, 0, 0	—	—	196, 170, 165, 162	—	—
1	0, 0, 0, 0	—	—	182, 200, 197, 161	—	—
5	0, 0, 0, 0	—	—	182, 161, 188, 182	—	—

(雄性) $Sxlp^e tTa^{(A)}$ x $tRe EGFP^{(II)}$ (雌性)

四环素浓度： 微克/毫升	荧光	雄 性	雌 性	无荧光	雄 性	雌 性
0	0, 0, 0, 0	—	—	196, 179, 165, 164	—	—
0.1	0, 0, 0, 0	—	—	179, 197, 198, 188	—	—
1	0, 0, 0, 0	—	—	198, 187, 190, 164	—	—
5	0, 0, 0, 0	—	—	170, 177, 199, 165	—	—

(雄性) $Sxlp^e tTa^{(A)}$; $tRe EGFP^{(II)}$ x $C(1)DX$ (雌性)

$C(1)DX$ 是复合物 X 染色体；有效地将两个 X 染色体连接在一起。因此，来自与 $C(1)DX$ 雌性杂交的雄性的 X 染色体，由儿子而不是女儿遗传。

结论

这些数据表明，如预期的，在一定浓度范围的四环素存在下，报告基因的表达关闭了。

实施例 3：重组染色体实验

将 40-45 年轻雌性和 20-25 年轻雄性在 25°C 下用含有所述的四环素添加剂的食物培育并让其交配，然后，在 3-4 天后，转移到正常（不含四环素的）食物。将蝇（flies）每天转移到有正常食物的新鲜小瓶中，共 12 天，然后在第 13 天移走。在子代发育时，所有的小瓶均在 25°C 下

培养。记录每个小瓶中的表现为成体的雄性和雌性子代的数目。

四环素浓度

Sx1^{pe}

四环素浓度	第 1 天		第 2 天		第 3 天		第 4 天		第 5 天		第 6 天		第 7 天	
微克/毫升	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性
0.1	103	0	98	0	89	0	92	0	105	0	95	0	110	0
1	128	0	137	0	150	0	136	0	111	0	87	0	100	0
5	110	0	111	0	95	0	90	0	144	0	93	0	138	0
20	131	0	126	0	133	0	120	0	93	0	99	0	111	0
100	139	0	127	0	145	0	110	0	149	0	128	0	94	0
500	95	11	133	12	145	1	137	1	86	0	112	0	128	0
1000	140	12	133	24	119	8	94	2	92	1	137	1	129	1
2000	110	35	97	25	94	16	138	12	115	2	126	1	145	1

四环素浓度	第 8 天		第 9 天		第 10 天		第 11 天		第 12 天		总计	
微克/毫升	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性
0.1	106	0	131	0	148	0	86	0	99	0	1262	0
1	106	0	109	0	97	0	124	0	114	0	1399	0
5	106	0	89	0	148	0	148	0	87	0	1359	0
20	87	0	149	0	104	0	113	0	132	0	1398	0
100	93	0	125	0	99	0	121	0	139	0	1469	0
500	142	0	129	0	114	0	131	0	126	0	1478	25
1000	89	0	94	0	97	0	138	0	87	0	1349	49
2000	94	0	137	0	99	0	141	0	143	0	1439	92

Sx1^{pe}-tTA, tRE-Ras64B^{V12} 在 X 染色体上

四环素浓 度	第 1 天		第 2 天		第 3 天		第 4 天		第 5 天		第 6 天		第 7 天	
微克/毫 升	雄性	雌 性	雄性	雌 性	雄性	雌 性	雄性	雌 性	雄性	雌 性	雄性	雌 性	雄性	雌 性
0.1	103	0	98	0	149	0	121	0	134	0	150	0	117	0
1	149	0	86	0	111	0	112	0	126	0	148	0	136	0
5	104	0	99	0	148	0	128	0	142	0	134	0	93	0
20	121	0	106	0	97	0	127	0	142	0	131	0	107	0
100	94	0	142	0	115	0	131	0	114	0	103	0	131	0
500	140	34	148	23	100	14	95	1	122	0	120	0	115	0
1000	110	29	87	12	138	22	145	17	91	5	106	1	102	1
2000	123	42	145	37	131	43	139	15	126	12	118	7	100	4

四环素浓度	第 8 天		第 9 天		第 10 天		第 11 天		第 12 天		总计	
微克/毫升	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性
0.1	138	0	142	0	147	0	130	0	112	0	1541	0
1	129	0	123	0	91	0	99	0	131	0	1441	0
5	99	0	106	0	95	0	144	0	129	0	1421	0
20	149	0	150	0	89	0	128	0	140	0	1487	0
100	93	0	119	0	143	0	87	0	144	0	1416	0
500	98	0	129	0	90	0	124	0	107	0	1388	72
1000	92	0	150	0	145	0	107	0	143	0	1416	87
2000	92	1	120	0	89	0	106	0	149	0	1438	161

Sxl^{pe}-tTA, tRE-Ras64B^{V12} 在第三染色体上。

四环素浓 度	第 1 天		第 2 天		第 3 天		第 4 天		第 5 天		第 6 天		第 7 天	
微克/毫 升	雄性	雌 性	雄性	雌 性	雄性	雌 性	雄性	雌 性	雄性	雌 性	雄性	雌 性	雄性	雌 性
0.1	97	0	136	0	152	0	130	0	108	0	114	0	88	0
1	102	0	99	0	134	0	171	0	171	0	118	0	91	0
5	130	0	159	0	156	0	91	0	84	0	127	0	110	0
20	76	0	129	0	126	0	79	0	89	0	98	0	94	0
100	112	0	145	0	130	0	124	0	79	0	109	0	134	0
500	136	2	79	0	161	0	102	0	171	0	151	0	161	0
1000	92	15	83	9	150	3	149	2	146	0	92	0	115	0
2000	127	21	95	14	153	3	164	4	135	1	97	1	144	0

四环素浓度	第 8 天		第 9 天		第 10 天		第 11 天		第 12 天		总计	
微克/毫升	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性
0.1	140	0	104	0	141	0	173	0	81	0	1464	0
1	104	0	120	0	171	0	102	0	144	0	1527	0
5	116	0	123	0	155	0	163	0	121	0	1535	0
20	122	0	103	0	126	0	123	0	78	0	1243	0
100	127	0	133	0	79	0	157	0	154	0	1483	0
500	164	0	95	0	160	0	154	0	91	0	1625	2
1000	168	0	153	0	80	0	95	0	79	0	1402	29
2000	158	0	103	0	129	0	141	0	97	0	1543	44

Sxl^{pe}-tTA, tRE-Msl-2^{Nopu} 在 X 染色体上。

四环素浓 度	第 1 天		第 2 天		第 3 天		第 4 天		第 5 天		第 6 天		第 7 天	
微克/毫 升	雄性	雌 性	雄性	雌 性	雄性	雌 性	雄性	雌 性	雄性	雌 性	雄性	雌 性	雄性	雌 性
0.1	111	0	108	0	130	0	69	0	101	0	110	0	130	0
1	89	0	106	0	119	0	70	0	87	0	117	0	138	0
5	112	0	80	0	68	0	130	0	78	0	93	0	78	0
20	92	0	83	0	129	0	127	0	66	0	69	0	95	0
100	72	0	90	0	72	0	66	0	106	0	122	0	100	0
500	78	0	118	0	69	0	67	0	88	0	83	0	135	0
1000	122	2	107	1	133	0	116	0	115	0	107	0	119	0
2000	134	12	79	14	123	5	130	1	102	0	114	0	83	0

四环素浓度	第 8 天		第 9 天		第 10 天		第 11 天		第 12 天		总计	
微克/毫升	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性
0.1	127	0	92	0	79	0	77	0	133	0	1267	0
1	71	0	104	0	81	0	124	0	65	0	1171	0
5	106	0	84	0	135	0	119	0	82	0	1165	0
20	101	0	71	0	108	0	74	0	112	0	1127	0
100	136	0	104	0	116	0	77	0	107	0	1168	0
500	128	0	104	0	73	0	106	0	88	0	1137	0
1000	101	0	115	0	86	0	96	0	92	0	1309	3
2000	130	0	105	0	120	0	104	0	101	0	1325	32

Sxl^{pe}-tTA, tRE-Msl-2^{Nopu} 在第三染色体上。

四环素浓度	第1天		第2天		第3天		第4天		第5天		第6天		第7天	
微克/毫升	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性
0.1	93	0	137	0	84	0	66	0	114	0	107	0	114	0
1	73	0	90	0	99	0	120	0	118	0	85	0	85	0
5	84	0	122	0	131	0	93	0	104	0	90	0	133	0
20	127	0	128	0	80	0	105	0	81	0	122	0	108	0
100	72	0	80	0	87	0	128	0	78	0	92	0	86	0
500	98	0	78	0	94	1	105	0	138	0	77	0	92	0
1000	117	1	105	2	130	1	130	1	82	0	88	0	113	0
2000	91	16	70	11	69	13	70	4	108	1	90	0	115	0

四环素浓度	第8天		第9天		第10天		第11天		第12天		总计	
微克/毫升	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性
0.1	117	0	78	0	123	0	125	0	121	0	1279	0
1	91	0	90	0	68	0	88	0	82	0	1089	0
5	89	0	70	0	138	0	85	0	100	0	1239	0
20	95	0	118	0	70	0	114	0	114	0	1262	0
100	66	0	137	0	85	0	109	0	93	0	1113	0
500	68	0	70	0	109	0	86	0	136	0	1151	1
1000	95	0	137	0	99	0	120	0	66	0	1282	5
2000	84	0	98	0	83	0	128	0	131	0	1137	45

Sxl^{pe}-tTA, tRE-Msl-1^{Mpu} 在 X 染色体上。

Hsp26

四环素浓 度	第 1 天		第 2 天		第 3 天		第 4 天		第 5 天		第 6 天		第 7 天	
微克/毫 升	雄性	雌 性	雄性	雌 性	雄性	雌 性	雄性	雌 性	雄性	雌 性	雄性	雌 性	雄性	雌 性
0.1	153	0	154	0	127	0	130	0	81	0	151	0	147	0
1	138	0	98	0	74	0	88	0	150	0	123	0	115	0
5	140	0	132	0	119	0	129	0	87	0	156	0	157	0
20	115	0	113	0	92	0	92	0	129	0	77	0	119	0
100	150	0	127	0	126	0	114	0	78	0	93	0	98	0
500	119	1	146	0	154	0	132	0	112	0	97	0	80	0
1000	77	5	109	2	105	2	85	0	84	0	127	0	91	0
2000	156	18	101	6	149	3	115	1	134	0	139	0	151	0

四环素浓度	第 8 天		第 9 天		第 10 天		第 11 天		第 12 天		总计	
微克/毫升	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性
0.1	117	0	81	0	106	0	135	0	141	0	1523	0
1	152	0	89	0	105	0	146	0	89	0	1367	0
5	79	0	148	0	120	0	92	0	119	0	1478	0
20	69	0	78	0	149	0	72	0	116	0	1221	0
100	121	0	126	0	157	0	141	0	143	0	1474	0
500	142	0	103	0	104	0	144	0	129	0	1462	1
1000	75	0	147	0	105	0	97	0	123	0	1225	9
2000	86	0	97	0	98	0	131	0	76	0	1433	28

Hsp26-tTA, tRE-Ms1-2^{Nopu} 在第二染色体上。

四环素浓 度	第 1 天		第 2 天		第 3 天		第 4 天		第 5 天		第 6 天		第 7 天	
微克/毫 升	雄性	雌 性	雄性	雌 性	雄性	雌 性	雄性	雌 性	雄性	雌 性	雄性	雌 性	雄性	雌 性
0.1	120	0	87	0	127	0	115	0	121	0	80	0	100	0
1	84	0	153	0	100	0	88	0	93	0	71	0	126	0
5	134	0	95	0	122	0	141	0	80	0	77	0	106	0
20	135	0	137	0	140	0	135	0	107	0	141	0	89	0
100	146	1	146	0	82	0	106	0	118	0	118	0	82	0
500	124	12	144	8	99	2	154	1	137	0	96	1	75	0
1000	72	27	85	17	76	15	87	12	102	5	93	5	69	3
2000	132	67	96	45	119	38	135	35	104	22	90	17	149	12

四环素浓度	第 8 天		第 9 天		第 10 天		第 11 天		第 12 天		总计	
微克/毫升	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性
0.1	151	0	79	0	108	0	69	0	107	0	1264	0
1	78	0	95	0	105	0	112	0	154	0	1259	0
5	135	0	84	0	152	0	145	0	142	0	1413	0
20	79	0	157	0	92	0	73	0	139	0	1424	0
100	96	0	135	0	86	0	106	0	157	0	1378	1
500	139	0	142	0	145	0	84	0	136	0	1475	24
1000	114	1	145	0	130	0	136	0	152	0	1261	85
2000	149	2	81	0	127	0	146	0	88	0	1416	238

Hsp26-tTA, tRE-Msl-1^{Mpu} 在第二染色体上。

Yp3

四环素浓 度	第 1 天		第 2 天		第 3 天		第 4 天		第 5 天		第 6 天		第 7 天	
微克/毫 升	雄性	雌 性	雄性	雌 性	雄性	雌 性	雄性	雌 性	雄性	雌 性	雄性	雌 性	雄性	雌 性
0.1	93	0	119	0	112	0	141	0	100	0	126	0	89	0
1	117	0	135	0	122	0	121	0	127	0	101	0	136	0
5	112	0	116	0	128	0	111	0	136	0	113	0	130	0
20	89	0	107	0	107	0	98	0	88	0	102	0	107	0
100	129	0	136	0	128	0	127	0	135	0	144	0	107	0
500	136	2	88	0	113	0	113	0	87	0	94	0	109	0
1000	107	13	140	5	110	0	141	0	98	0	129	0	88	0
2000	119	32	102	15	107	12	109	9	109	8	140	2	127	0

四环素浓度	第 8 天		第 9 天		第 10 天		第 11 天		第 12 天		总计	
微克/毫升	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性
0.1	105	0	133	0	93	0	131	0	121	0	1363	0
1	90	0	119	0	94	0	98	0	100	0	1360	0
5	119	0	96	0	88	0	144	0	91	0	1384	0
20	135	0	126	0	143	0	123	0	141	0	1366	0
100	96	0	92	0	104	0	94	0	115	0	1407	0
500	141	0	144	0	123	0	104	0	124	0	1376	2
1000	138	0	105	0	124	0	115	0	114	0	1409	18
2000	114	0	123	0	132	0	115	0	107	0	1404	78

Yp3-tTA, tRE-Ras64B^{V12} 在第二染色体上。

四环素浓度	第1天		第2天		第3天		第4天		第5天		第6天		第7天	
微克/毫升	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性
0.1	121	0	94	0	103	0	93	0	96	0	119	0	119	0
1	95	0	123	0	79	0	78	0	130	0	103	0	112	0
5	109	0	110	0	118	0	124	0	86	0	122	0	90	0
20	81	0	89	0	127	0	82	0	81	0	79	0	128	0
100	112	0	87	1	87	1	113	0	95	1	91	1	84	1
500	84	21	96	16	86	15	124	9	123	5	86	3	106	1
1000	100	47	110	12	109	8	103	13	102	9	97	2	82	6
2000	127	63	130	54	128	34	117	21	89	12	87	11	90	4

四环素浓度	第8天		第9天		第10天		第11天		第12天		总计	
微克/毫升	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性
0.1	84	0	127	0	104	0	76	0	95	0	1231	0
1	94	0	106	0	83	0	93	0	113	0	1209	0
5	132	0	126	0	76	0	128	0	102	0	1323	0
20	119	0	99	0	90	0	106	0	87	0	1168	0
100	85	1	122	0	114	0	90	0	126	0	1206	6
500	85	1	93	0	111	0	111	0	104	0	1209	71
1000	95	0	113	0	110	0	85	0	87	0	1193	97
2000	131	1	128	0	91	0	95	0	82	0	1295	200

Yp3-tTA, tRE-Ms1-2^{Nopu} 在第二染色体上。

四环素浓 度	第 1 天		第 2 天		第 3 天		第 4 天		第 5 天		第 6 天		第 7 天	
微克/毫 升	雄性	雌 性	雄性	雌 性	雄性	雌 性	雄性	雌 性	雄性	雌 性	雄性	雌 性	雄性	雌 性
0.1	91	0	84	0	107	0	80	0	88	0	92	0	99	0
1	117	0	92	0	128	0	80	0	104	0	116	2	8	0
5	82	0	123	0	116	0	120	2	89	0	90	0	95	0
20	92	1	101	0	87	0	109	0	81	0	121	0	83	1
100	108	13	130	9	131	5	99	7	109	3	123	1	107	1
500	78	22	85	16	80	12	106	15	130	11	91	10	118	7
1000	130	35	86	42	78	26	116	14	80	12	82	17	77	15
2000	116	79	130	72	78	44	101	29	132	32	94	22	89	16

四环素浓度	第 8 天		第 9 天		第 10 天		第 11 天		第 12 天		总计	
微克/毫升	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性
0.1	88	1	135	0	123	0	128	0	114	0	1229	1
1	101	0	127	2	84	0	101	0	79	0	1137	4
5	80	0	94	0	127	0	128	3	86	0	1230	5
20	132	0	81	0	88	0	112	0	127	0	1214	2
100	106	1	132	0	81	0	115	0	107	0	1348	40
500	115	2	98	0	86	0	82	4	115	0	1184	99
1000	131	3	104	1	99	0	125	0	108	0	1216	165
2000	91	8	88	2	85	5	114	0	80	0	1198	309

Yp3-tTA, tRE-Ms1-1^{Mpu} 在第二染色体上。

结论

这些数据表明向母代喂食高浓度的四环素有一些保护作用，但是所有的重组染色体在宽广范围的（亲代）四环素浓度起非常有效的作用，唯一的例外是“Yp3 tTa, tRe Msl-1^{Mpu} 在第二染色体上”，它甚至在低四环素浓度时也有部分（<1%）逃脱者。由于在雄性黑尾果蝇中没有减数分裂重组，如果需要，可以将任何这类重组染色体用于遗传雌雄分离或昆虫控制项目。实际上，黑尾果蝇不是一种农业害虫或疾病载体，但是，这些数据证明可以通过这种方法有效的消除一种性别。

实施例 4：使用非-抗生素四环素类似物

可以在 25°C 下，在 1 微克/毫升浓度的表氧四环素或 0.1 微克/毫升浓度的脱水四环素中容易地维持重组染色体原种，表明这些非抗生素四环素类似物可以有效地阻遏 tTA 响应性的基因表达。

表氧四环素

在下列实验中，使用了标准范围的添加剂浓度（0.05-20 微克/毫升）。我们不能在两种最低的浓度下维持原种，因此标记为 n. d. (=“未完成”)。

表氧四环素浓度：微克/毫升	雌性	雄性
0.05	n. d.	n. d.
0.1	n. d.	n. d.
1	0	1306
5	0	1581
20	0	1495

Sxlp^etTa, tRe Ras64B^{V12} 在 X 染色体上。

表氧四环素浓度：微克/毫升	雌性	雄性
0.05	n. d.	n. d.
0.1	n. d.	n. d.
1	0	1165
5	0	1279
20	0	1257

Sxlp^etTa, tRe Ras64B^{V12} 在第三染色体上。

表氧四环素浓度：微克/毫升	雌性	雄性
0.05	n. d.	n. d.
0.1	n. d.	n. d.
1	0	1076
5	0	1119
20	0	1159

Sxlp^etTa, tRe Msl-2^{Nopu} 在 X 染色体上。

表氧四环素浓度：微克/毫升	雌性	雄性
0.05	n. d.	n. d.
0.1	n. d.	n. d.
1	0	1250
5	0	1300
20	0	1364

Sxlp^etTa, tRe Msl-2^{Nopu} 在第三染色体上。

表氧四环素浓度：微克/毫升	雌性	雄性
0.05	n. d.	n. d.
0.1	n. d.	n. d.
1	0	1483
5	0	1585
20	0	1565

Sxlp^etTa, tRe Msl-1^{Mpu} 在 X 染色体上。

表氧四环素浓度：微克/毫升	雌性	雄性
0.05	n. d.	n. d.
0.1	n. d.	n. d.
1	0	1362
5	0	1181
20	0	1403

Hsp26 tTa, tRe Msl-2^{Nopu} 在第二染色体上。

表氧四环素浓度：微克/毫升	雌性	雄性
0.05	n. d.	n. d.
0.1	n. d.	n. d.
1	0	1243
5	0	1409
20	0	1373

Hsp26 tTa, tRe Msl-1^{Mpu} 在第二染色体上。

表氧四环素浓度：微克/毫升	雌性	雄性
0.05	n. d.	n. d.
0.1	n. d.	n. d.
1	0	1431
5	0	1424
20	0	1387

Yp3 tTa, tRe Ras64B^{V12} 在第二染色体上。

表氧四环素浓度：微克/毫升	雌性	雄性
0.05	n. d.	n. d.
0.1	n. d.	n. d.
1	0	1350
5	0	1308
20	0	1343

Yp3 tTa, tRe Msl-1^{Mpu} 在 X 染色体上。

脱水四环素

脱水四环素浓度：微克/毫升	雌性	雄性
0.05	0	1452
0.1	0	1528
1	0	1614
5	0	1448
20	0	1592

Sxlp^e tTa, tRe Ras64B^{V12} 在 X 染色体上。

脱水四环素浓度：微克/毫升	雌性	雄性
0.05	0	1381
0.1	0	1304
1	0	1121
5	0	1269
20	0	1247

Sxlp^e tTa, tRe Ras64B^{V12} 在第三染色体上。

脱水四环素浓度：微克/毫升	雌性	雄性
0.05	0	1114
0.1	0	1120
1	0	1130
5	0	1148
20	0	1128

Sxlp^e tTa, tRe Msl-2^{Nopu} 在 X 染色体上。

脱水四环素浓度：微克/毫升	雌性	雄性
0.05	0	1331
0.1	0	1431
1	0	1309
5	0	1359
20	1	1362

Sxlp^e tTa, tRe Msl-2^{Nopu} 在第三染色体上。

脱水四环素浓度：微克/毫升	雌性	雄性
0.05	0	1582
0.1	0	1499
1	0	1474
5	0	1619
20	5	1533

Sxlp^e tTa, tRe Msl-1^{Mpu} 在 X 染色体上。

脱水四环素浓度：微克/毫升	雌性	雄性
0.05	0	707
0.1	0	1457
1	0	1437
5	0	773
20	5	1447

Hsp26 tTa, tRe Msl-2^{Nopu} 在第二染色体上。

脱水四环素浓度：微克/毫升	雌性	雄性
0.05	0	1492
0.1	0	1426
1	0	1418
5	0	1457
20	8	1499

Hsp26 tTa, tRe Msl-1^{Mpu} 在第二染色体上。

脱水四环素浓度：微克/毫升	雌性	雄性
0.05	0	1449
0.1	0	1411
1	0	1397
5	0	1430
20	2	1428

Yp3 tTa, tRe Ras64B^{v12} 在第二染色体上。

脱水四环素浓度：微克/毫升	雌性	雄性
0.05	0	1339
0.1	0	1263
1	0	1265
5	0	1284
20	0	1297

Yp3 tTa, tRe Msl-1^{Mpu} 在 X 染色体上。

脱水四环素浓度：微克/毫升	雌性	雄性
0.05	0	1316
0.1	0	1358
1	0	1354
5	0	1344
20	1	1312

Yp3 tTa, tRe Msl-2^{Nopu} 在第二染色体上。

结论

这些数据表明可以使用四环素类似物的非抗生素类似物代替四环素。在使用表氧四环素时，需要稍微高些的浓度来阻遏基因表达。如果不考虑不同的有效浓度的差别，两者的亲代传递的特征与四环素没有实质性的差别。

实施例 5 温度的效应

上述的所有实验均在 25°C 下进行，是果蝇培养的标准温度。但是，野外的昆虫毫无疑问将暴露于不同的温度，所以，我们考察了该系统的效率被温度影响的程度。如同重组染色体实验一样，让用具有指示的四环素添加剂的食物在 25°C 下培养的 40-45 只年轻原始雌性和 20-25 年轻雄性进行杂交，然后，在 3-4 天后转移到正常（不含四环素的）食物。每天将这些蝇转移到有正常食物的小瓶。记录每小瓶中成长到成虫的雄性和雌性后代的数目。这些实验在 18°C 或 29°C 进行。

18°C

四环素浓度 微克/毫升	雌性	雄性
0.1	8	982
1	10	912
5	7	871

Sxlp^e tTA, tRe Ras64B^{V12} 在 X 染色体上。

四环素浓度 微克/毫升	雌性	雄性
0.1	6	1065
1	9	1124
5	7	989

Sxlp^e tTa, tRe Ras64B^{V12} 在第三染色体上。

四环素浓度 微克/毫升	雌性	雄性
0.1	6	695
1	8	816
5	8	785

Sxlp^e tTa, tRe Msl-2^{Nopu} 在 X 染色体上。

四环素浓度 微克/毫升	雌性	雄性
0.1	2	973
1	9	985
5	5	983

Sxlp^e tTa, tRe Msl-2^{Nopu} 在第三染色体上。

四环素浓度 微克/毫升	雌性	雄性
0.1	8	840
1	5	927
5	8	837

Sxlp^e tTa, tRe Msl-1^{Mpu} 在 X 染色体上。

四环素浓度 微克/毫升	雌性	雄性
0.1	8	832
1	7	879
5	4	818

HsP26 tTa, tRe Msl-2^{N_{opu}} 在第二染色体上。

四环素浓度 微克/毫升	雌性	雄性
0.1	6	628
1	3	614
5	5	712

Hsp26 tTa, tRe Msl-1^{M_{pu}} 在第二染色体上。

四环素浓度 微克/毫升	雌性	雄性
0.1	8	1152
1	12	1122
5	3	1225

Yp3 tTa, tRe Msl-2^{N_{opu}} 在第二染色体上。

四环素浓度 微克/毫升	雌性	雄性
0.1	5	1303
1	14	1218
5	7	1386

Yp3 tTa, tRe Msl-1^{M_{pu}} 在 X 染色体上。

四环素浓度 微克/毫升	雌性	雄性
0.1	2	1190
1	4	1213
5	0	1058

Yp3 tTa, tRe Ras64B^{V12} 在第二染色体上。

29°C

四环素浓度 微克/毫升	雌性	雄性
0.1	0	716
1	0	711
5	0	715

Sxlp^e tTa, tRe Ras64B^{V12} 在 X 染色体上。

四环素浓度 微克/毫升	雌性	雄性
0.1	0	781
1	0	749
5	0	741

Sxlp^e tTa, tRe Ras64B^{V12} 在第三染色体上。

四环素浓度 微克/毫升	雌性	雄性
0.1	0	682
1	0	804
5	0	648

Sxlp^e tTa, tRe Msl-2^{Nopu} 在 X 染色体上。

四环素浓度 微克/毫升	雌性	雄性
0.1	0	732
1	0	771
5	0	816

Sxlp^e tTa, tRe Msl-1^{Mpu} 在 X 染色体上。

四环素浓度 微克/毫升	雌性	雄性
0.1	0	749
1	0	737
5	0	718

Sxlp^e tTa, tRe Msl-2^{Nopu} 在第三染色体上。

四环素浓度 微克/毫升	雌性	雄性
0.1	0	696
1	0	658
5	0	711

HsP26 tTa, tRe Msl-2^{Nopu} 在第二染色体上。

四环素浓度 微克/毫升	雌性	雄性
0.1	0	733
1	0	776
5	0	728

Hsp26 tTa, tRe Msl-1^{Mpu} 在第二染色体上。

四环素浓度 微克/毫升	雌性	雄性
0.1	0	765
1	0	702
5	0	773

Yp3 tTa, tRe Msl-2^{N_{opu}} 在第二染色体上。

四环素浓度 微克/毫升	雌性	雄性
0.1	0	799
1	0	749
5	0	744

Yp3 tTa, tRe Msl-1^{M_{pu}} 在 X 染色体上。

四环素浓度 微克/毫升	雌性	雄性
0.1	0	718
1	0	753
5	0	757

Yp3 tTa, tRe Ras64B^{V12} 在第二染色体上。

结论

在低温度下有轻微的泄漏，但是仅有<1%的水平逃脱者。所有的形式均在 29°C 非常地有效。这是重要的，因为多数需要控制的最重要的靶物种是热带的并且生长在大约 28°C 的培养条件下，例如地中海蜡实蝇 (*Ceratitis capitata*)，冈比亚按蚊 (*Anopheles gambiae*)，埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*)。

实施例 6:

本实施例举例说明了使用胚专一性启动子的 Tc 和 TC-可阻遏的致死的母体传递。

材料和方法

质粒构建

使用寡核苷酸引物

5'-GCCGAGCTCTTGACGGTTGAAGTACGAATG-3'和

5'-CGGCCATTCATATGCGTATATTCACATG-3'

从质粒 pW⁺ 2.8kb bnk 拯救片段 (Schejter and Wieschaus, (1993), Cell 75, 373-385) 扩增大约 2 kb 的 bnk 启动子片段。将这一片段消化并以 *SacI-XhoI* 片段亚克隆到 pUHD15-1 (Gossen and Bujard, (1992), Proc Natl Acad Sci USA 89, 5547-51)。将这一克隆中的含有 bnk-tTa 的 *XhoI-HpaI* 片段亚克隆到用 *XhoI* 和 *HpaI* 消化的 pW8 (Klemenz *et al.*, (1987), Nucl. Acids Res. 15, 3947-59) 产生 pP{bnk-tTa}。

通过在 *EcoRI* 和 *NotI* 位点之间加入互补寡核苷酸

(5'-AATTGCCACCATGGCTCATATGGAATTCAGATCTG-3'和

5'-GGCCGCAGATCTGATTCCATATGAGCCATGGTGGGC-3')

来修饰 W.T.P-2 (Bello *et al.*, (1998), Development 125, 2193-2202) 提供了共有序列翻译起始序列 (Kozak, (1987), Nucleic Acids Res 15, 8125-48)。基于通过双杂交筛选的果蝇 PP1c-结合蛋白质获得的部分序列 (Alphey *et al.*, (1997), J. Cell Biol. 138, 395-409) 使用 (Alphey, (1997), BioTech. 22, 481-486) 的方法从 pNB40 (Brown and Kafatos, (1988), J. Mol. Biol. 203, 425-437) 分离了含有 果蝇的 Nipp1 同系物的完整编码区域的 cDNA (Van Eynde *et al.*, (1995), J. Biol Chem 270, 28068-74)。将完整编码区域和 3'UTR 克隆到如上修饰的 W.T.P-2 的 *NdeI* 和 *NotI* 位点, 产生 pP{tRe-Nipp1Dm}。

果蝇培养

将蝇用标准的酵母/玉米粉/琼脂食物养殖, 酵母浓度为 45-50 克/升。以相同的配方, 加入盐酸四环素 (Sigma-Aldrich) 溶液至适当的终浓度制备含有 Tc 的食物。

组织化学

以 12 小时的间隔从 bnk-tTA/tRe-lacZ 的杂交收集胚后代, 并且然后

如 Ashburner, (1989), Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press 所述将 β -半乳糖苷酶染色。

结果

四环素的母体传递

当与野生型昆虫交配时，大量繁殖的显性致死基因或遗传系统纯合的昆虫品系不会有后代。在这方面，该致死基因的作用时间是没关系的。但是，为了使大量繁殖的昆虫可以用作对照剂，我们考虑显性致死的作用时间可能是高度重要的。成虫期的致死阶段可能杀死或至少降低释放的成虫在交配前的适合度。这将明显地是达不到预期目的的。许多农业害虫通过幼虫阶段的取食危害农作物。因此，需要尽早杀死其后代，优选的在胚阶段。然而，胚不会取食因此不会摄取致死遗传系统的阻遏物（四环素）。昆虫胚对多数大分子也是不可通透的，因此外源的四环素不能渗透。考虑到胚致死阶段的优势，我们检测了雌性果蝇摄取的四环素是否能够传递到它们的卵并从而使它们的后代有足够的浓度来抑制 Tc-可阻遏的基因的表型。

我们使用了一种果蝇品系，其中雌性而不是雄性的存活需要 Tc。雌性专一性致死是由于在雌性幼虫和成虫的脂肪体 (Thomas *et al.*, (2000), Science 287, 2474-2476) 毒性基因 Ras64B^{V12} 的表达造成的。在食物中补充 0.1 微克/毫升 Tc 培养这种品系足以抑制毒性基因的表达，使雄性和雌性均可存活。我们有充分理由相信如果雌性果蝇摄取的四环素能够传递到它的卵并由此传递到它的子代，就可能向卵中加载足够高浓度使后代甚至在缺乏 Tc 的培养基上也能够存活。我们发现用补充有 500 微克/毫升或更高的 Tc 的食物饲养亲代可以使小部分雌性后代存活（表 1）。我们检测了几种其它品系和其它启动子-致死基因组合得到类似结果（未发表资料）。我们得出结论：可以通过喂食雌性 Tc 向其子代引入足够量的 Tc 以阻抑 tTa-依赖的基因表达。

tTa 的胚-专一性表达

已知在果蝇胚中表达的多种基因中，大部分也在后期表达。例如，众所周知的参与设立胚的基本机体方案 (laying down the basic body plan) 的发育基因在后期被重新用于形成构成成虫结构的附属肢体和成虫盘。

对于许多其它胚基因，没有严格的检测后期表达的可能性。瓶颈（bottleneck）（*bnk*）是报道的少数几个仅在胚中表达的基因之一。*bnk*是在核周期 13 和 14 之间果蝇胚细胞化（cellularisation）过程中肌动蛋白微丝重新组织所需的蛋白（Schejter and Wieschaus, (1993), Cell 75, 373-385）。它的转录物仅在核周期 11 至 14 高水平出现。我们构建了携带处于 *bnk* 启动子片段控制下的 tTa 开放阅读框架的稳定转化的昆虫品系。使用 tTa-响应构建体 tRe-lacZ（Bello *et al.*, (1998), Development 125, 2193-2202）检测了 *bnk*-tTa 在胚中核其它发育阶段激活转录的能力。我们发现 tTa 蛋白质在胚中表达并且可以指导报告子构建体的表达。

tTa-依赖的转录激活受到 Tc 的阻抑。tTa 结合特定的 DNA 序列，四环素响应元件(tRe)。Tc 结合到 tTa 并且以此防止 tTa 蛋白质结合到 DNA。我们因此尝试通过在亲代食物中补充 Tc 或通过将胚播种到补充有 Tc 的培养基来抑制报告蛋白基因的表达。通过将亲代在收集卵之前置于含有 1 微克/毫升 Tc 的培养基中至少两天获得对报告蛋白基因的有效抑制。将胚播种到含有 Tc 的培养基看来不能影响报告蛋白基因的表达。这些数据提示 Tc 可以通过母亲成卵过程进入卵中并且可以在发育的早期阶段影响 tTa-介导的转录，但是 Tc 不能从其所处的基质中扩散入胚。

在胚中有活力的一种“致死基因”

为了构建母体 Tc-依赖的显性致死遗传系统，我们将携带 *bnk*-tTa 的稳定插入物的蝇与携带 tRe-Ras64B^{V12} 插入物的蝇杂交。我们先前的研究表明 tRe-Ras64B^{V12} 在较晚阶段与一定范围的雌性-专一性和非-性别-专一性 tTa 系组合是有毒性的（Thomas *et al.*, (2000), Science 287, 2474-2476）。出乎我们意料，携带 *bnk*-tTa 和 tRe-Ras64B^{V12} 的胚存活到成虫时期，与亲代或合子暴露于 Tc 无关（表 2 和未显示资料）。考虑到上述胚报告蛋白基因表达，我们得出结论：在 *bnk*-tTa 有活性的导致胚致死的时期，Ras64B^{V12} 的表达不是毒性的或没有足够的毒性。

由于异位的 Ras64B^{V12} 在我们使用的条件下明显缺乏胚毒性，我们将另外的毒性基因置于 tRe 的控制之下。我们选择使用 Nipp1Dm，哺乳动物 NIPP-1 的果蝇同系物，一种 1 型蛋白磷酸酶的核抑制剂（Beullens *et al.*, (1992), J.Biol.Chem. 267, 16538-16544; Van Eynde *et al.*, (1995), J Biol

Chem 270, 28068-74)。在这种系统中使用 NIPP1 作为“致死基因”有多种优点。携带 *bnk-tTa* 或 *tRe-Nipp1* 纯合的插入物的蝇互相杂交。喂养补充有 Tc 的培养基的蝇产生有存活力的 F_1 子代；在未补充 Tc 的培养基上培养的昆虫不产生有存活能力的 F_1 子代（表 2）。另外， F_1 的存活不受饲养 F_1 的培养基是否含有 Tc 的影响。因此，我们就这样构建了一种可被亲代食物中的 Tc 阻抑的有效的显性致死遗传系统。

表 1 高剂量的母体 Tc 能够抑制子代中的 tTa。

Tc 浓度 μg/ml	第 1 天		第 2 天		第 3 天		第 4 天		第 5 天		第 6 天		第 7 天		第 8 天		第 9 天		第 10 天		第 11 天		第 12 天		总计	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
0.1	93	0	119	0	112	0	141	0	100	0	126	0	89	0	105	0	133	0	93	0	131	0	121	0	1363	0
1	117	0	135	0	122	0	121	0	127	0	101	0	136	0	90	0	119	0	94	0	98	0	100	0	1360	0
5	112	0	116	0	128	0	111	0	136	0	113	0	130	0	119	0	96	0	88	0	144	0	91	0	1384	0
20	89	0	107	0	107	0	98	0	88	0	102	0	107	0	135	0	126	0	143	0	123	0	141	0	1366	0
100	129	0	136	0	128	0	127	0	135	0	144	0	107	0	96	0	92	0	104	0	94	0	115	0	1407	0
500	136	2	88	0	113	0	113	0	87	0	94	0	109	0	141	0	144	0	123	0	104	0	124	0	1376	2
1000	107	13	140	5	110	0	141	0	98	0	129	0	88	0	138	0	105	0	124	0	115	0	114	0	1409	18
2000	119	32	102	15	107	12	109	9	109	8	140	2	127	0	114	0	123	0	132	0	115	0	107	0	1404	78

检测了第二染色体上纯合插入了 *Yp3-tTA* 和 *tRe-Ras64B^{V12}* 的品系的亲代食物中的 Tc 的作用。将 40-45 只年轻雌性和 20-25 只年轻雄性在 25℃ 用含有所说的四环素添加剂的食物饲养并使其交配，然后，在 3-4 天后转移到正常（无四环素）食物。将蝇每天转移到有正常食物的新鲜小瓶中，共 12 天，然后，在第 13 天移走。在子代发育时所有的小瓶均在 25℃ 下培养。记录表现为成体的雄性和雌性后代的总数目。雌性后代的存活明显的依赖于饲养它们的亲代的 Tc 浓度，以及将亲代从 Tc 培养基移开与产卵之间的时间跨度。

表 2. 使用胚-专一性启动子的 Tc-可阻抑致死。

	Tc(微克/毫升)	雄性	雌性
<i>bnk-tTa</i> x <i>tRe-Nipp1Dm</i>	0	0	0
	0.1	60	58
	1.0	78	82

将雄性 *bnk-tTa* 纯合体与雌性 *tRe-Ras64B^{V12}* 或 *tRe-Nipp1Dm* 纯合体交配。将这些蝇在缺乏 Tc 的培养基上培养，但在交配前会置于含有不同浓度 Tc 的食物。允许它们在这种食物上产卵 9 天，然后移去亲代。计数每种性别的成虫后代。与 *bnk-tTa* 组合，*tRe-Nipp1Dm* 对两种性别均造成 Tc-可阻抑的致死，但 *tRe-Ras64B^{V12}* 则不然。

实施例 7：模块化转化载体

本实施例详述了一种载体的构建，该载体适用于转化以产生含有本发明的致死遗传系统的生物体。

本模块化载体的目的是能够快速制造适用于给定品种的转化构建体。在本实施例中，目的是制造显性可抑制致死。这是通过向此构建体中插入适当的启动子，然后用于转化目的品种来实现的。启动子优选的衍生自目的品系本身，这可能是保证启动子在目的品系中有所需的专一性（例如雌性-专一性）的最直接和安全的方法。这并不是必需的并且实际上在实施例中我们使用了修饰的蚕蛾（*Bombyx mori*）的肌动蛋白基因启动子，目的是用于红铃虫，一种棉花害虫。

已经成功的使用 PiggyBac 转化广泛范围的害虫，包括双翅目、鞘翅目、鳞翅目等，但并非在每种情况下 *Act5C-EGFP* 均必定为最佳的，或最优转化标记。质粒是这样构建的，系统的核心元件（*tTat*、*Re-Nipp1* 以及隔离子（insulator））侧翼是稀少的限制性酶（*NotI* 和 *SbfI-PmeI-AscI* 多克隆位点）独特切点，使得将这些元件亚克隆到新得转化载体很容易。类似地，可以使用其它的隔离子或另外的插入到启动子 5'端的隔离子，以防御侧翼染色质的位置效应。

载体的一般安排显示于图 1，元件如下，

tTa 包括：*tTa* 开放阅读框和 SV40 polyA 信号，均以 *EcoRI-BamHI* 形式来自 pUHD15-1neo (Gossen and Bujard, 1992)。用 *XhoI* 和 *EcoRI* 消化 pUHD15-1 并且寡核苷酸对(oligo pair)插入其中破坏了两种位点并产生 *AscI* 位点。用 *HpaI* 和 *BamHI* 消化这种质粒(pUHD15-1Asc)并插入另一个寡核苷酸对：

tTa 3'接头+

5'-gcggccgc ac gggccc a ctcgag cac aagctt c ggtacc ac gaattc-3'

tTa 3'接头-

5'-agct gaattc gt ggtacc g aagctt gtg ctcgag a gggccc gt gcggccgc-3'

以产生 pUHD15Asc3'接头#42。

tRe-Nipp1Dm 包括：通过在 EcoRI 和 NotI 位点之间插入寡核苷酸对“Kozak Spe +/-”修饰来自 Bruno Bello (Bello *et al.*, (1998), Development 125, 2193-2202)的 tRe 载体 W.T.P-2 形成 pWTP-KozakSpe。这样提供了共有序列翻译起始序列。

Kozak Spe+/-: 5'-aattgccaccatggaattcactagtgc-3'

3'-cggtgtgtacctaagtgatcacgccgg-5'

修饰 pNB40 中的 Nipp1Dm cDNA (Brown and Kafatos, (1998), J. Mol. Biol. 203, 425-437) 使其在起始密码子有 EcoRI 位点, 然后以 EcoRI-{末端补平的 NotI}亚克隆到用 EcoRI 和 StuI 切割的 pWTP-KozakSpe。将 tRe-Nipp1Dm-hsp70 polyA 片段以部分 XhoI-HindIII 切割并亚克隆到用 XhoI 和 HindIII 切割的 pUHD15Asc3' #43, 形成 ptTatReNipp1#77。附录了这一片段的完整的预测的序列。使用这一序列可以容易的通过 RT-PCR 或 PCR 从基因组 DNA 制备 Nipp1Dm DNA。

PiggyBac 和质粒载体衍生自来自 A1 Handler 的 p3E1.2-white (Handler *et al.*, (1998), Proc Natl Acad Sci USA 95, 7520-5)。地中海果蝇的 *white* 基因, 最初使用接头以 NotI 片段插入到 piggyBac 的 HpaI 位点, 通过 NotI 消化和重新环化除去了。通过 EcoRI 和 SalI 消化、末端补平和重新环化除去了一组外来的限制性位点载体序列 (piggyBac 外侧), 形成 p3E1△RI-Sal。然后, 用 BglII 和 NotI 消化这种质粒并插入一段寡核苷酸对来增加有用的限制性位点:

piggy 接头 2+/-: 5'-ggcc ctcgag aga aggcct gcggccgc tgt ggcgcgcc aga gttaaac agt cctgcagg-3'

3'-gagctc tct tccgga cgccggcg aca ccgcgcgg tct caaatttg tca ggacgtcc ctag-5'

产生质粒是 pPB-接头 2#93。

将来自 pP{CaSpeR} 中的 Act5C-EGFP (Jean-Marc Reichhart) 的 4.2kb XhoI-EcoRV 片段亚克隆到 XhoI-StuI 酶切的 pPB-接头 2, 以加入转化标记 **Act5C-EGFP**, 形成 pPB-Act5CEGFP#181。

通过如下加入 **HS4 隔离子**: 通过 BamHI 从 Gaey Felsenfeld 酶切 pJC13-1 (Chung *et al.*, (1993), Cell 74, 505-14), 并且重新环化, 以除去 neo 报告基因, 然后以 {末端补平的 Sall}-KpnI 形式切除 HS4 二聚体 (2 x 1.2kb = 2.4kb 总计) 并亚克隆到通过顺序与 HindIII、Klenow DNA 聚合酶和 KpnI (即 KpnI 粘性末端-末端补平的 HindIII) 温育的 ptTatReNipp1#77, 形成 ptTatReNipp1HS4#101。

通过使用寡核苷酸 SpeI-ApaI:

SpeI-ApaI: CTAGAAGGGCCCTT

从 Stephanie Namciu 改变 apoB3'MAR (Namciu *et al.*, (1998), Mol Cell Biol 18, 2382-91) 的 SpeI 位点至 ApaI 而加入 **apoB 隔离子**。

然后, 将 apoB 隔离子以 0.8kb 的 ApaI-NotI 片段亚克隆到 ApaI-NotI 消化的 ptTatReNipp1HS4#101。

将来自 ptTatReNipp1HS4#101 的 AscI-NotI 片段亚克隆到 pPB-Act5CEGFP#181, 形成 pRIDL#204。

插入一种启动子的实施例:

1) 使用 Platinum Pfx 聚合酶 (Life Technologies) 和寡核苷酸:

BmA3 5':

5'-aaacAATTCTGATAGCGTGCGCGTTAC-3'

BmA3 3'Asc-2:

5'-ggtaggcgcgcc TGGCGACCGGTGGATCCGAATG-3'

通过 PCR 从 pJP88 (John Peloquin) (Peloquin *et al.*, (2000), Insect Mol Biol 9, 323-33s) 扩增了大约 190bp 的 **BmA³** 启动子片段。用 AscI 消化这种 PCR 产物并亚克隆到 AscI-PmeI 消化的 pRIDL#204, 形成 pRIDL-BmA³。

2) 一种 *Aedes aegypti* **Vg1** 启动子, 我们先前用于在黄热病蚊 *Aedes aegypti* 中产生雌性-专一性表达, 使用 Platinum Pfx 聚合酶 (Life Technologies) 和寡核苷酸:

Aedes vg5'

aaac gaattcaccaccaggcagtg

Aedes vg3'AscI

ggaggcgcgcc tcaagtatccggcagctgttc

用 AscI 消化 PCR 产物并亚克隆到 AscI-PmeI 消化的 pRIDL#204, 产生 pRIDL-A.a.Vgl。

为了用于植物, 与 tetO 重复组合使用的最小启动子是适当的植物最小启动子。为了表达的长期稳定性, 它优选地是没有基因沉默的最小启动子。驱动 tTa 表达的启动子将适当地是一种植物启动子, 例如在某系统中的用于绒毡层-专一性表达的 A9 启动子, 该系统设计为在缺乏阻抑物时消除了花粉产生。

tRe-Nipp1的预测序列 (XhoI-HindIII)

衍生自 W.T.P.-2(Belo et al., (1998), Development 125: 2193)的 nt 1-543, 其中 1-309 含有 7 个重复的 tet 操纵子序列 (tetO), 随后是 98nt 的 P 元件转座酶核心启动子, 来自 Carnegie4, -52/+51 与转录起始有关, 通过 SmaI-PstI 接头(合成寡核苷酸, GGGCTGCAG)连接到前导序列 hsp70, 从 CaSpeR-hs(Thummel and Pirrotta, (1991), Dros. Inf. New. 2,)直到它的多接头的 EcoRI 位点。下一部分来自合成寡核苷酸并且提供了共有序列 (consensus) 翻译起始和一些限制性位点, 随后是果蝇 Nipp1 的编码区和 3'UTR 至 polyA 序列, 从 pNB40 中的未公开的 cDNA(Brown and Kafatos, (1988), J.Mol.Biol. 203: 425,)直到 NotI 位点, 它已经末端补平了并克隆到 StuI 位点。StuI 位点和随后的序列来自 W.T.P.-2 并且是衍生于 CaSpeR-hs, 它主要是来自 hsp70 的非转录尾区 (trailer) (3' UTR) 序列, 侧翼是一些限制性位点。

CTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATC
 AGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGT
 CGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTAGGAGTCCCTATCAG
 TGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCG
 AGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGCTCGGTACGCTTACCGAAGT
 ATACACTTAAATTCAGTGACGTTTGGCTTGTGAGAGGAAAGGTTGTGTGCGGACGAATTTTTT
 TTTGAAAACATTAAACCCTTACGGGCTGCAGTAAAGTGCAAGTTAAAGTGAATCAATTAAAAGTA
 ACCAGCAACCAAGTAAATCAACTGCAACTACTGAAATCTGCCAAGAAGTAATTATTGAATACAA
 GAAGAGAACTCTGAATAGGGAATTGGGAATTGCCACCATGGCTCATATGGAATTCATGGCTAAC
 AGCTACGACATACCCAGTTGGGCTGGAAAACCGCCCACTGGCTTACATCTGGATGTGCTAAAGG
 ACGACAACTAGTACAAAACTGATGGTGGATGAAAAAAGATGCTATCTATTGGTCGCAACAG
 TCAAAATGAACGACTTCTGCATAGACCATGCCTCTTGTTCCGGGTCCACTCGGCGTTTGTCTAC
 CACAAGCACCTCAACATAGCCTACCTCGTGGATCTGGGGTCCACTCATGGCACCTTTATTGGAA
 CACTCAGATTGGAAGCGCACAAAGCCACACAGCTGCAGATTAATAGCACCTTCCACTTTGGGGC
 TTCTACCCGGAACATACATACTCAGGGAACGACCCTCTGGCCACCACAGCAACATCATGGAAGAC
 CTGCCGCTCAGTGAAACCAGCGATGGCGCTCTCTGGGCTGCCCGAAAGCCAAAAGGAGCTTG
 ATAATCTTACAGAATACAAACACGGCCCAATCGGCGCATCTCAATGCTGGGCATCGATGATGA
 TACCAATATGCGAAAGCAAAACGCCTTGAAACAGGGACGGCGCACTCGAAATGTCACATTTAAC
 GATGAGGAGATTGTCAATCCTGAGGATGTGGATCCTAATGTGGGACGCTTCAGGAACTTGG
 TACAAACCACTGTGGTGGCCGCAAGAGGGCTCGCTGCGACGTCAACCATATGGGCATCCATTC
 GGGCAACAGCAGTTTGTCCAGTGCCAATGCCGCACATGTACACCAAATGTTCCAGCAGAGCCTA
 GTTGACATGAAGCAGCAGCATAGGGAATGCCTCCGCCAATGCGGTGCTCCACTCGCCTACTA
 ATTCCCTATATCAAGGTCTACCGGCCGAAATGCATGGCAAGGGTGACCTAGAGCCCATCTCCCC
 GCTGAGCATTGGTTCCAAGTTGGGCCTATTGCTCCCGAATCCTGCGCCTGAAGTGTCGCCAGTC
 TATGACGAAGCTGTGGAGACCTCGACATTGGCTCAAAGTTGGCCGTCGCTAATGCAAACGTTT
 GTCGCTTCGGTGAGGATCCGCATGACTCGAGTGGCGAGGGCGATTGCTGTGCCACAGAAAAA
 GAAATACGCCAAGGAAGCATGGCCAGGTGCAAGCCCATGTTGGGGCAGCTGTAATTGCGTATT
 AACAAAATAATTAAGATTCCACCTACGATTTTCTCAAGCATATGATTGACAACACACTCTGGAG
 TAATATTTGTTTTATTAGACTTTTAACGTAAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAGCAATGCTGCGGCCCTAATTCCAGCTGAGCGCCGGTCGCTACCATTACAGTTGGTCT
 GGTGTGCGGGATCCGTCGACTAAGGCCAAAGAGTCTAATTTTGTTCATCAATGGGTATAACA
 TATGGGTATATTATAAGTTTGTTTAAGTTTTTGAGACTGATAAGAATGTTTCGATCGAATAT
 TCCATAGAACAACAATAGTATTACCTAATTACCAAGTCTTAATTTAGCAAAAATGTTATTGCTT
 ATAGAAAAAATAAATTATTTATTTGAAATTTAAAGTCAACTTGTCAATTAATGTCTTGTAGACT
 TTTGAAAGTCTTACGATACATTAGTATCTATATACATGGTTCAATCTACATTCTATATTATGA
 TGATTTCTTTAGCTAGTAATACATTTTAATTATATTTCGGCTTTGATGATTTTCTGATTTTCC
 GAACGGATTTTCGTAGACCCCTTCGATCTCATAATGGCTCATTTTATTGCGATGGACGGTCAGG
 AGAGCTCGAATTAACGGGGATCCGTCGACCTGCAGCCCAAGCTT

实施例 8 昆虫控制模型

方法

Thomas 等(Science 287, 2474-2476, 2000)给出了对昆虫控制程序的效率的简单的数学模型, 包括 SIT 和不同形式的 ‘RIDL’ (= ‘携带显性致死的昆虫的释放(release of insects carrying a dominant lethal)’ -此处用于指本发明的生物体和方法), 并且提及还可以考虑增强的系统, 包括释放的

对显性雌性致死（DFLs）在多个不连锁的基因座（loci）是纯合的以及将 DFL 连接到减数分裂驱动/分离畸变系统的雄性（Thomas et al., 2000, *Science* 287, 2474-2476）。我们此处考虑这些和其它系统的增强对昆虫控制的效率的影响。

一般地，我们假定所有的控制程序在每一害虫代释放稳定数目的雄性（参看下面）。提供的这一数目（“输入”）是相对于初始的雄性害虫种群的。模型考虑离散的代。

假定雌性按丰度和适合度选择配偶，因此雌性将以 p_i 的可能性选择 i 型的配偶，因此：

$$p_i = n_i r_i / (S_j n_j r_j)$$

其中 n_i 是 i 型雄性昆虫的数目， r_i 是相对于适合度设为 1 的野生型雄性， i 型的适合度。昆虫的类型可能依赖于其基因型及其代-特别地，我们会考虑如下情况：其中释放的昆虫句有降低的适合度，但是它们的雄性后代，无论基因型如何，具有与野生型雄性相同的适合度。

受精能力方面我们有考虑两种情况。在密度-依赖情况下，我们假定每个与能繁殖的雄性交配的雌性产生 R_0 雌性后代-其中有比例 s_i 存活到成虫时期，其中由 s_i 下式给出：

$$s_i = 1 / (1 + (a o_i)^b)$$

其中 o_i 是存活到密度依赖性起作用的时间点的后代数目（Maynard Smith and Slatkin, 1973 *Ecology* 54, 384-391），并且 a 和 b 是参数。Rogers 和 Randolph（1984 *Insect Sci. Applic.* 5, 419-23）在 SIT 程序中考虑了这种密度-依赖性系统，并且表明 SIT 程序的效率很大程度上由靶昆虫种群的天然复原决定的，其特征为参数 b （Rogers and Randolph, 1984 *Insect Sci. Applic.* 5, 419-23）。一个重要的考虑是密度依赖性致死的时间，特别是，是否释放的雄性是在密度依赖机制起作用之前还是之后释放，以及是否 RIDL-诱导的死亡是在密度-依赖机制起作用之前还是之后实现。在缺乏控制时，如果在其承载能力内（ $s_i = 1/R_0$ ），这种种群会保持恒定并在干扰后，倾向于返回该水平。对已经建立的种群，这是适当的模型。这并不意味着没有尝试控制-控制方法诸如繁殖位点消除将降低种群的稳定水平，而不是降低种群相对与该稳定水平的大小。

在非密度依赖情况下，我们假定每个与能繁殖的雄性交配的雌性产生 R_0 雌性后代，在下一代中全部存活到成虫时期。这实际上是密度依赖情况下的极限-种群如此之小使得基本上没有密度-依赖性死亡率并且 $s_1 \approx 1$ 。因此，在不存在控制时，如果 $R_0 > 1$ ，种群会指数增长。这对新引入或爆发的害虫品种，或从例如由于在 RIDL 或 SIT 程序之前设计用于降低靶品种的数目的短时间强烈的控制程序等造成严重损耗中恢复的种群，将是适当的模型。

例如，对于一个非常简单的没有密度依赖的系统， R_0 等于 2 并且在每一代输入 1.5 不育雄性，该模型（model）将以下列方式工作：

- (i) 初始种群包含等量的野生型雄性和野生型雌性。计数相对初始雌性种群的所有数目，因此根据定义是 1.0 并且初始野生型雄性种群在此处也是 1.0。由于我们只考虑通常有相同数量的雄性和雌性的种群，在这些实例中初始种群的雄性总是 1.0。
- (ii) 输入 1.5 不育雄性，即该雄性为初始种群中的雌性的 1.5 倍。
- (iii) 60%的雌性与不育雄性交配（由于 2.5 的雄性中，60%是不育的）并且不产生子代。40%的雌性与野生型雄性交配产生 0.8 雌性后代（ $0.8 = R_0 * (0.4 * 1)$ 与野生型雄性交配的雌性）。它们还产生 0.8 的雄性后代。
- (iv) 因此，第二代由等量的野生型雄性和雌性（各 0.8）组成。
- (v) 输入 1.5 的不育雄性。
- (vi) 65%的雌性与不育雄性交配（因为 2.3 雄性中，65%是不育的）并且不产生后代。35%的雌性与野生型雄性交配产生 0.56 的雌性后代（ $0.56 = R_0 * (0.35 * 0.8)$ 与野生型雄性交配的雌性）。它们也产生 0.56 的雄性后代。

并且如此往复直至消除该种群。

SIT

在每种情况下，我们比较不同形式的 RIDL 系统和 SIT 系统的效率。对于 SIT，我们考虑最优化的情况，有完美的性别-分离，和 100%不育。这种 SIT 本身就是一种高度有效的控制方法，并且我们还考虑到在不存

在任何控制时种群会达到的水平，但是我们表明不同形式的 RIDL 是更加有效的，并且存在很多情况，其中 RIDL 能够控制害虫种群，而 SIT 不能控制。这些模型没有考虑 RIDL 的其它优点，例如更加易于将这种系统转移到新的品种（参看实施例 7 的载体）。

输入

一般地，我们假定所有的控制程序在害虫的每一代释放恒定数目的雄性。这一数目（“输入”）以相对于初始雄性害虫种群的形式给出。一种可能的 RIDL 策略释放混合-性别种群，已知一种性别在其生命周期的某些晚期时间点，例如性别成熟前会被性别-专一性致死遗传系统的致死效应杀死。其中的这些个体在同种中能够诱导密度-依赖性死亡率的情况下（图 6a 和 7a），我们假定除了雄性之外，释放同样数目的雌性。

在任何生命周期阶段释放的能力导致了另一个策略，其中将个体以休眠状态储存，然后同时释放，能够比其它方式有更大的释放。例如，可以将许多蚊子种的胚在相对干燥的条件下储存几个月而几乎不损失存活能力，然后简单的将它们置于水溶液环境中诱导孵化和幼虫发育。这种方法的一个主要优点是大量养殖便利（facility）可以在冬天继续运行，而靶昆虫处于滞育期并且因此对不育释放不敏感。在春天，然后可以使用大得多的释放，使用储存的不同代的胚。此处，我们模拟了储存两代的结果-适于工厂生产量，并且使用它将在头两次释放代的大小加倍（图 8）。虽然储存胚的能力不是对 RIDL 专一性的，SIT 程序通常需要将这胚生长到较晚的发育阶段，以通过辐射使它们不育。由于工厂的培育空间，而不是胚的有效性可能是限制因素，RIDL 程序在任何生命周期阶段释放的潜能对这种新的策略是关键的。尽管如此，我们仍在图 8 中考虑了这种释放策略会赋予传统的 SIT 程序的优点。图 8 中的各曲线均基于前面的图谱，其具有在头两代中的双倍大小的释放。为了与没有双倍大小的释放的传统 SIT 比较，比较这些曲线和它们所来源的前面的曲线。

致死阶段和使用多-阶段致死系统（MPLS）

如果简单的需要杀死所有的后代，或一种性别的所有后代，则致死

阶段 (lethal phase) 是不重要的。但是，我们考虑到工程化胚专一性致死有许多优势。致死阶段必须在昆虫释放的发育阶段前结束，否则它们会损失适合度或在撤回阻抑物时，例如释放后立即死亡。胚专一性致死保证了没有幼虫出现来损害作物或动物。对于疾病载体诸如蚊子，这一点不重要，它们只有成虫阶段才传播疾病，但是对于许多作物害虫这一点明显是重要的，因为它是造成经济损失的贪婪的幼虫。胚-专一性致死使最后的和最大量-繁殖的一代在缺乏阻遏物的食物上生长，降低了成本和与大量 Tc 相关的环境危害。胚-专一性致死（或其它早期致死）还可以与晚期性别-专一性致死组合，例如与雌性专一性致死组合。我们已经证明这使得能够构建一种品系，其中性别-分离和“不育”是在释放前从最后一代撤掉 Tc 的自然结果。我们称这种系统是多-阶段致死系统 (muti-phase lethal system) (MPLS)，表明有两种不同特性的不同致死阶段。在很多繁殖/分布的情况下，这种系统的遗传学类似于放射绝育雄性的单一-性别释放，因为只有雄性到达并且它们在天然环境与野生雄性交配后没有能存活的后代。但是，在下面的模型中可以看到两种主要的优点。首先，当然，MPLS 雄性未经辐射，并且因此遭遇因为辐射所导致的适应性和寿命损失。其次，由于只需要两种（或多种）致死阶段不重叠，而不是其中一个阶段是胚专一性的，我们可以安排第一个致死阶段在野生型的密度-依赖死亡阶段之后。例如，对于蚊子，为了防止大多数的蚊子-传播的疾病的传播（例如疟疾、登革热、黄热病），只需要防止雌性第二次摄食血液。杀死作为蛹、正出现的成虫或就在第一次食血后的成虫的雌性都因此是适当的。早期非-性别-专一性致死阶段只需要比此时更早，并且可以因此晚至例如成虫期。此外备选地，晚期幼虫/蛹发育的第一次致死阶段是可能的。众所周知适用于这些阶段的启动子-食血可诱导的基因来进行食血后的杀死等等。使用首先晚于野生种群中密度-依赖死亡阶段后起作用的致死阶段意味着由于 RIDL 系统的致死效应而晚期死亡的个体仍然与它们的野生型同种竞争资源并因此趋向于增加这些野生型同种的死亡率。

在下面的图中，SIT 和 MPLS 给出相同的结果，除非另有说明。

将 DFL 连接到减数分裂驱动/分离畸变系统

减数分裂驱动系统作用是增加 RIDL 系统（图 2）的效率。已知有不同效率的减数分裂驱动系统存在于广泛范围的物种中，包括果蝇和蚊子。在正常的孟德尔遗传中，给定的染色体的两种同源染色体同等可能地被遗传，即各有 50%机会遗传到每一后代个体。减数分裂驱动/分离畸变系统的结果是一种染色体优选地被遗传。我们通过考虑其中携带 RIDL 系统的染色体由携带这种染色体及其野生种群的同源染色体的杂合子的后代优选地遗传的系统来探索这种效应。由于减数分裂驱动/分离畸变系统效率不同，我们考虑了 50%(即没有减数分裂驱动/分离畸变)、60%、70%、80%、90%和 100%的遗传频率。更高的遗传频率总是使 RIDL 系统更有效。

释放的雄性在多个染色体上是 DFL 纯合的

与 SIT 不同，RIDL 系统的作用可以潜在地通过增加该系统在释放的个体中的拷贝数增加。我们考虑了释放在一个、两个或三个不连锁的基因座上有显性雌性-专一性致死纯合的雄性的结果。我们发现释放的有多重 DFL 染色体的雄性会更有效的控制种群大小（图 3）。

降低的适合度

图 4 和图 5 证实了降低的适合度对 SIT 和 RIDL 系统的效应（有减数分裂驱动和多重染色体系统）。明显地，在释放的雄性中降低的适合度减少了这种控制系统的效率。在图 4b 和 5b 中，我们假定 RIDL 雄性有两倍于 SIT 雄性的竞争交配适合度。这是一种相当保守的估计。辐射降低了辐射的昆虫的竞争交配的能力（估计对于地中海果蝇有两倍）并且还降低了他们的寿命（估计对于地中海果蝇有 2-5 倍）。对于地中海果蝇，这降低了整体竞争交配能力估计有 4-10 倍，对红铃虫更多，对旋丽蝇要少一些。因此，未辐射的 RIDL 蝇较之于其受辐射的 SIT 等价物有整体两倍的优势是非常保守的估计。我们发现对于控制程序的成本和效率而言，甚至这种优势都是极度显著的（图 4b 和 5b）。

密度依赖机制

我们考虑三种情况：

- (a) 密度依赖致死在 RIDL-诱导的死亡之前起作用，并且作用于新释放的 RIDL 或 SIT 昆虫，
- (b) 密度依赖致死在 RIDL-诱导的死亡之前起作用，但不作用于新释放的 RIDL 昆虫，以及
- (c) 密度依赖致死在 RIDL-诱导的死亡之后起作用，但不作用于新释放的 RIDL 昆虫。

情况 (a) 模拟成虫致死阶段和在成虫的水平起作用的密度-依赖致死。RIDL 的成虫致死阶段可能适用于疟疾载体，其中的雌性只需在第一次食血后大约一周内杀死，以防止该疾病的传播。另外备选地，这种情况还模拟了早期释放和密度依赖性阶段，这是对于 RIDL 可利用的，其中释放种群可以在任何生命周期阶段释放，但不适用于 SIT，它需要在释放前进行性别分离（如果使用）和辐射。限制了能够释放的生命周期阶段范围。

情况 (b) 是重要并且是新的情况。这代表了在 RIDL-诱导的致死前起作用的密度-依赖致死。对于蚊子，幼虫竞争食物很可能是密度-依赖性效应的阶段。RIDL-诱导的致死可以安全地比这一时期晚，因为只有雌性成虫传播疾病。这种致死可以通过使用晚期-作用启动子获得，诸如实例 7 中的载体的 vitellogenin 基因（用于雌性-专一性致死）。这种策略还可能使用多-阶段致死系统 (MPLS)，其中的非-性别-专一性致死阶段晚于密度-依赖性致死。对于 SIT，没有相当的策略。

情况 (c) 代表在较晚生命周期阶段，例如成虫阶段释放，以及早期 RIDL-诱导的致死，例如胚。密度-依赖致死在它们之间。这可能代表了一些吃作物的农业害虫，这时幼虫阶段造成损害，并且因此，释放这些阶段的生物或将 RIDL-诱导的致死安排到如此晚使得幼虫在死之前已经造成了损害是不合适的。与 (a) 和 (b) 的情况不同，在这种情况下，与 SIT 相比，RIDL 没有特别的生命-周期-衍生优势。

图 6 和 7 图示了延迟 RIDL-诱导的致死直到密度依赖致死之后的好处，以及在密度-依赖致死前释放昆虫（雄性、雌性均包括）的潜在的进

一步的好处。这些图形进一步举例说明从增加的减数分裂驱动系统和多重染色体 DFL 系统获得的益处。图 6b、6c、7b 和 7c 揭示 SIT 实际上可以导致比不存在该控制方案时更稳定的种群。这种效应先前已经被 Rogers 和 Randolph 提及 (Rogers and Randolph, 1984 *Insect Sci.Applic.* 5, 419-23)。

概括要点

对假定的繁殖力和致死率的模式，容易地预测增加减数分裂驱动将改善效率，增加具有 DFL 的基因座的数量可以增加效率，并且与野生型雄性相比，降低的释放的雄性的适合度将降低效率。但是，该模型证明了这些变化的相对影响并且最重要地证明了降低的适合度可能简单地作用于减缓了昆虫种群的控制，但也可以意味着没有较大量的 RIDL 和 SIT 雄性的输入不能消除昆虫种群。类似地，增加的减数分裂驱动可以作用于改善给定系统来消除昆虫种群，这种种群用 50%的减数分裂驱动没有被消除。此外，不是所有的结果都是直观地明显的。上面提及了与不存在该控制程序相比，SIT 实际上可以导致更高稳定种群的可能性。另外，明显地，在某些情况下，野生种群在控制程序的早期阶段实际上可能升高并且尽管如此，长期而言还是会被消灭。例如，在图 2b 中，有 70%的减数分裂驱动，从第一至第七代，种群高于其初始水平，但最后仍被控制了。

注意：在几个图中，图解 (key) 中给出长的破折线在图中显示为连续的或分割的线。尽管如此，从上下文中可以清楚的辨认哪条线是哪条线。

详细地，解释各图如下：

图 2：减数分裂驱动系统。50%、60%、70%、80%、90%和 100%，对于单一基因座系统，没有降低的适合度。粗体黑线是各种情况下的 SIT 系统。RIDL 系统以灰色线绘制。

a R_0 是 1.5，输入是 0.5（相对于初始种群）。SIT 保持种群在恒定的水平，而 RIDL 系统快速降低该种群。如果不将种群进行控制，15 代

后，我们预期有 $(1.5)^{15}=438$ 倍于初始种群的昆虫。

b R_0 是 2.25，输入是 1（相对于初始种群）。种群不能通过有 50% 或 60%减数分裂驱动的 SIT 或 RIDL 控制。15 代后，它们分别有 8000、2200 和 360 倍于初始种群的昆虫。如果不控制种群，15 代后，我们预期有 $(2.25)^{15}=191751$ 倍于初始种群的昆虫。使用较高的减数分裂驱动水平，种群快速的置于控制之下。

图 3：在 RIDL 系统中使用的多重非连锁的基因座。在各种情况下，粗体黑线是 SIT 系统。RIDL 系统用灰线绘制。

a R_0 是 1.5，输入是 0.5（相对于初始种群）。SIT 保持种群在恒定的水平，而 RIDL 系统快速降低种群。如果不将种群进行控制，15 代后，我们预期有 $(1.5)^{15}=438$ 倍于初始种群的昆虫。

b R_0 是 2.25，输入是 1（相对于初始种群）。种群不能被有 1 或 2 个基因座的 SIT 或 RIDL 控制。15 代后，它们分别有 8000、2200 和 34 倍于初始种群的昆虫。如果不控制种群，15 代后，我们预期有 $(2.25)^{15}=191751$ 倍于初始种群的昆虫。使用 3 个基因座 RIDL 系统，种群快速地置于控制之下。

图 4：减数分裂驱动系统。50%、60%、70%、80%、90%和 100%，对于单一基因座系统，有降低的适合度。粗体黑线是各种情况下的 SIT 系统。RIDL 系统以灰色线绘制。

a R_0 是 1.5，输入是 0.5（相对于初始种群）。SIT 和释放的 RIDL 昆虫的适合度是野生型昆虫的 80%。不论亲代如何，假定随后的各代与野生型有相同的适合度。种群不受有 50%减数分裂驱动的 SIT 和 RIDL 的控制。15 代后，它们分别有 44 和 1.5 倍于初始种群的昆虫。如果种群不进行控制，我们预期在第 15 代有 $(1.5)^{15}=438$ 倍于初始种群的昆虫。尽管有降低的适合度，在较大的减数分裂驱动水平种群很快置于控制之下。

b R_0 是 1.5，输入是 1.75（相对于初始种群）。SIT 昆虫的适合度是野生型昆虫的 25%，而释放的 RIDL 昆虫有野生型昆虫的适合度的 50%。不论亲代如何，假定随后的各代与野生型有相同的适合度。种群不受 SIT 的控制。15 代后，它有 23 倍于初始种群的昆虫。如果种群不进行控制，通过 15 代，我们预期有 $(1.5)^{15}=438$ 倍于初始种群的昆虫。尽管有降低的

适合度，用 RIDL 系统很快将种群置于控制之下。

图 5: 在 RIDL 系统中使用的多重非连锁的基因座，有降低的适合度。在各种情况下，粗体黑线是 SIT 系统。RIDL 系统用灰线绘制。

a R_0 是 1.5，输入是 0.5（相对于初始种群）。SIT 和释放的 RIDL 昆虫的适合度是野生型昆虫的 80%。不论亲代如何，假定随后的各代与野生型有相同的适合度。种群不受有 50 减数分裂驱动的 SIT 或 RIDL 的控制。通过 15 代，它们分别有 44 和 1.5 于初始种群的昆虫。如果种群不进行控制，我们预期通过 15 代有 $(1.5)^{15}=438$ 倍于初始种群的昆虫。尽管有降低的适合度，用多基因座很快将种群置于控制之下。

b R_0 是 1.5，输入是 1.75（相对于初始种群）。SIT 的适合度是野生型昆虫的 25%，而释放的 RIDL 昆虫有野生型昆虫的适合度的 50%。不论亲代如何，假定随后的各代与野生型有相同的适合度。种群不受 SIT 的控制。通过 15 代，它有 23 倍于初始种群的昆虫。如果种群不进行控制，我们预期通过 15 代有 $(1.5)^{15}=438$ 倍于初始种群的昆虫。尽管有降低的适合度，用 RIDL 系统很快将种群置于控制之下。

图 6: 减数分裂驱动系统。50%、60%、70%、80%、90%和 100%，单一基因座系统，没有降低的适合度-在密度-依赖系统中。粗体黑线是各种情况下的 SIT 系统。RIDL 系统以灰色线绘制。在所有情况下， $a=1$ ， $b=2$ ， R_0 是 4.5 并且输入是 1（相对于初始种群）。

a 密度依赖致死在 RIDL-诱导的致死之前起作用并且作用于新释放的 RIDL 昆虫。SIT 保持种群恒定在相对于初始种群 0.8 的水平，而 RIDL 系统快速降低种群。如果不将种群进行控制，我们预期种群会保持稳定在初始的大小。

b 密度依赖致死在 RIDL-诱导的致死之前起作用，但不作用于新释放的 RIDL 昆虫。通过有 50%或 60%减数分裂驱动的 SIT 或 RIDL 消除种群。它们分别将种群稳定在相对于初始种群的 1.2、0.4 和 0.3 的水平。用较大的减数分裂驱动水平使种群很快被控制。如果种群不置于控制之下，我们预期种群保持稳定在初始的大小。

c 密度依赖致死在 RIDL-诱导的致死之后起作用，但不作用于新释放的 RIDL 昆虫。通过有 50%、60%或 70%减数分裂驱动的 SIT 或 RIDL

消除种群。它们分别将种群稳定在相对于初始种群的 1.2、0.75、0.7 和 0.6 的水平。尽管有降低的适合度，用较大的减数分裂驱动水平使种群很快被控制。如果种群不置于控制之下，我们预期种群保持稳定在初始的大小。

图 7：在 RIDL 系统中使用的多重非连锁基因座，没有降低的适合度-在密度依赖系统。粗体黑线是各种情况下的 SIT 系统。RIDL 系统以灰色线绘制的。在所有情况下， $a=1$ ， $b=2$ ， R_0 是 4.5 并且输入是 1（相对于初始种群）。

a 密度依赖致死在 RIDL-诱导的致死之前起作用并且作用于新释放的 RIDL 昆虫。SIT 保持种群恒定在相对于初始种群 0.8 的水平，而 RIDL 系统快速降低种群。如果不将种群进行控制，我们预期种群会保持稳定在初始的大小。

b 密度依赖致死在 RIDL-诱导的致死之前起作用，但不作用于新释放的 RIDL 昆虫。通过有一个基因座的 SIT 或 RIDL 保持种群在恒定的水平。它们分别将种群稳定在相对于初始种群的 1.2 和 0.4 的水平。用两个或三个基因座系统消除种群。如果种群不置于控制之下，我们预期种群保持稳定在初始的大小。

c 密度依赖性致死在 RIDL-诱导的致死之后起作用，但不作用于新释放的 RIDL 昆虫。通过有 1、2 或 3 个基因座的 SIT 或 RIDL 保持种群在稳定的水平。它们分别将种群稳定在相对于初始种群的 1.2、0.75、0.63 和 0.5 的水平。如果种群不置于控制之下，我们预期种群保持稳定在初始的大小。

图 8

图 a-d 是基于图 2 的情况，头两个释放的大小倍增。

- (a) $R_0=1.5$ ，晚期输入=0.5 (b) $R_0=2.25$ ，晚期输入=1
(c) $R_0=1.5$ ，晚期输入=0.5 (d) $R_0=2.25$ ，晚期输入=1

图 e-g 是基于图 6 的情况，头两个释放的大小倍增。

- (e) 参看图 6

(f) 参看图 6b

(g) 参看图 6c

图 h-j 是基于图 7 的情况，头两个释放的大小倍增。

(h) 参看图 7a

(i) 参看图 7b

(j) 参看图 7c。

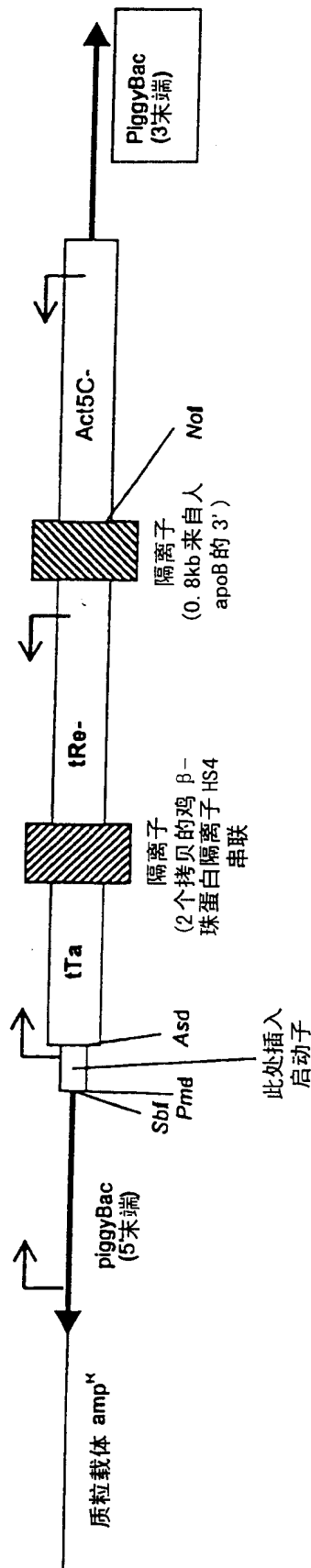


图 1

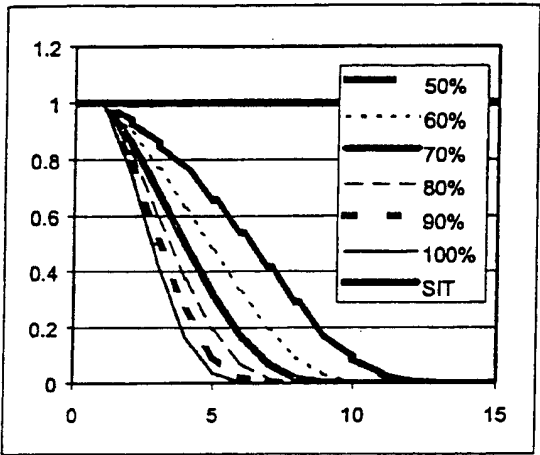


图 2a

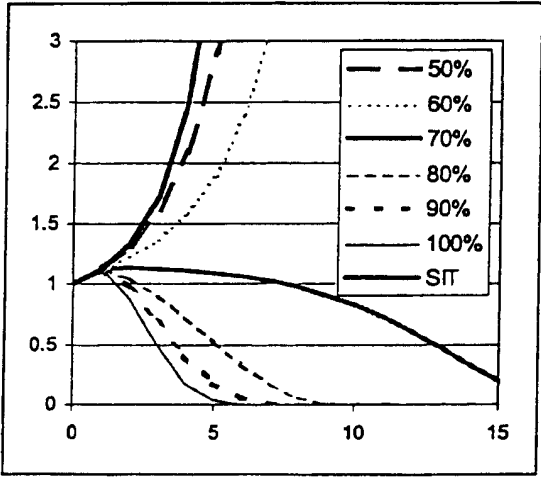


图 2b

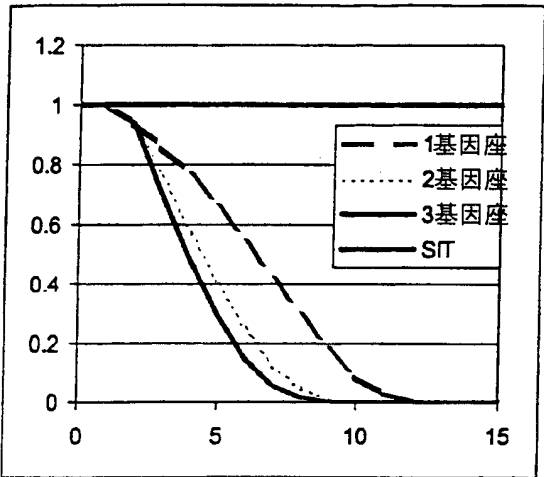


图 3a

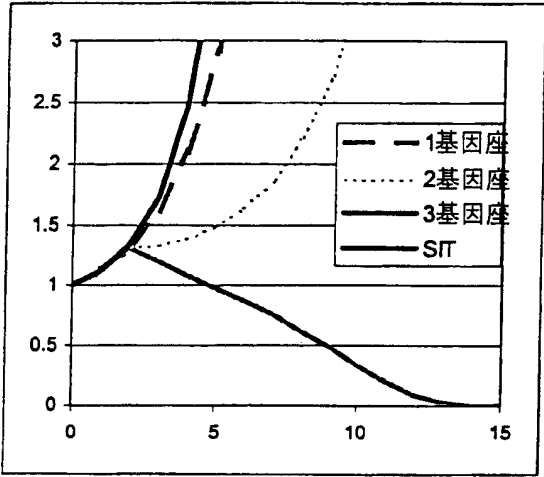


图 3b

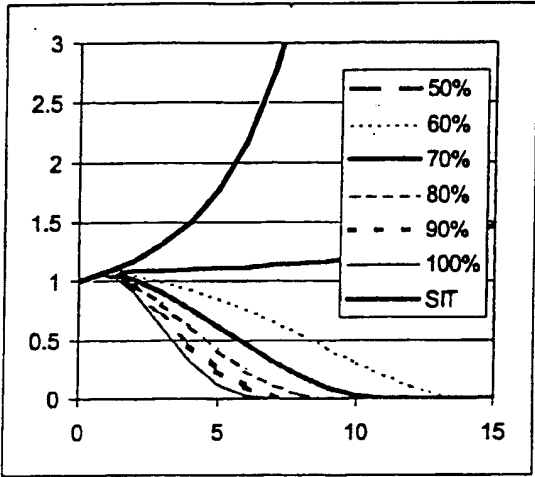


图 4a

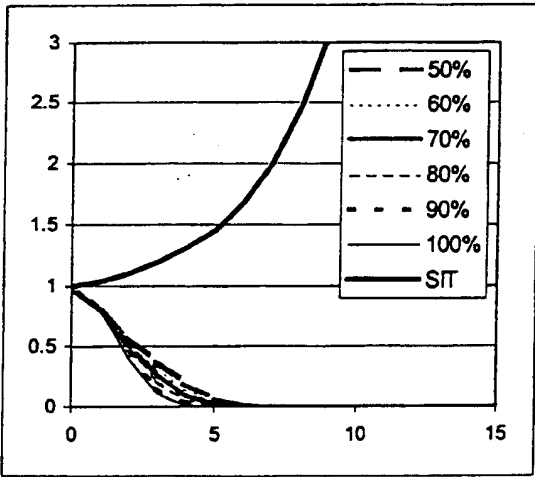


图 4b

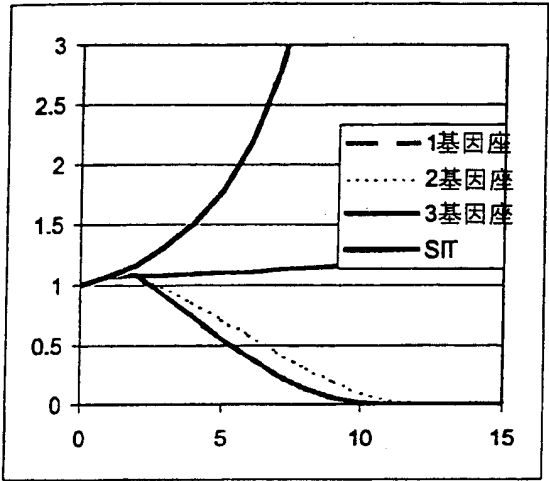


图 5a

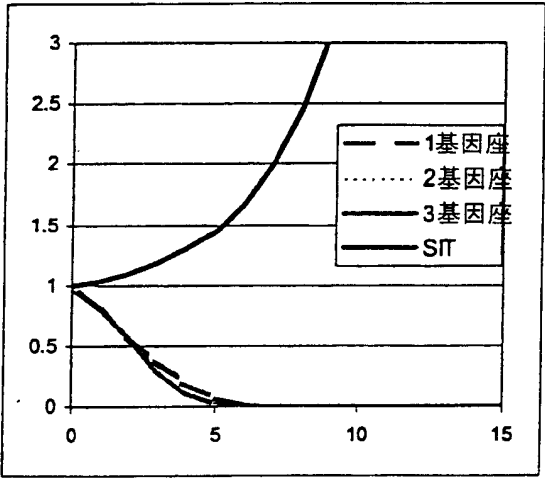


图 5b

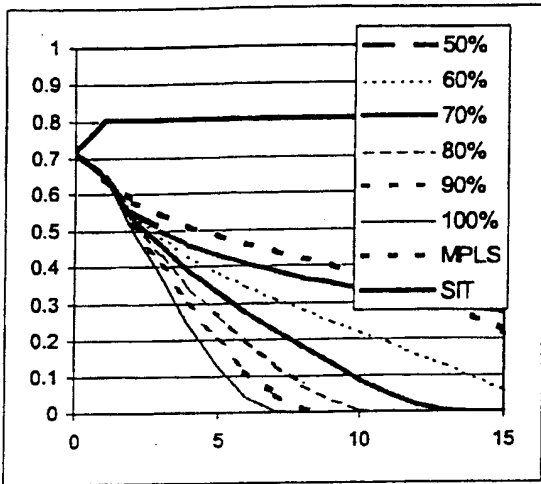


图 6a

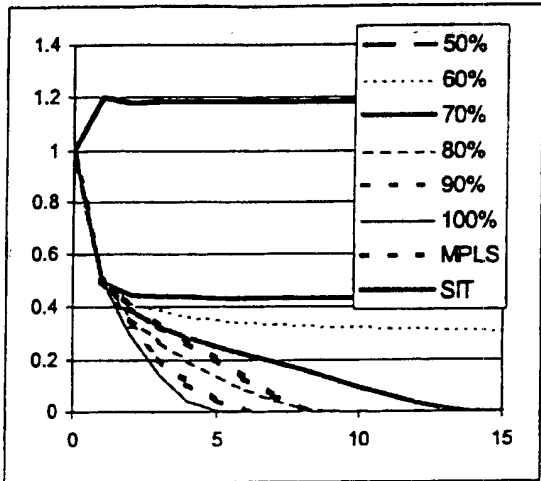


图 6b

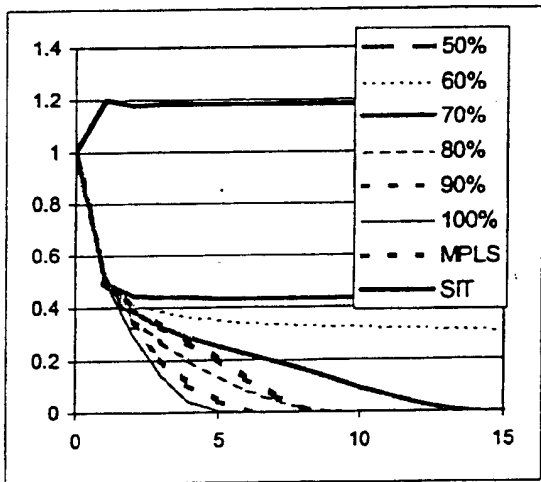


图 6c

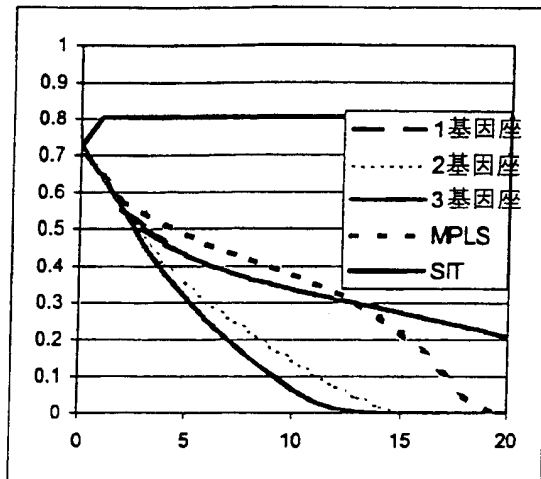


图 7a

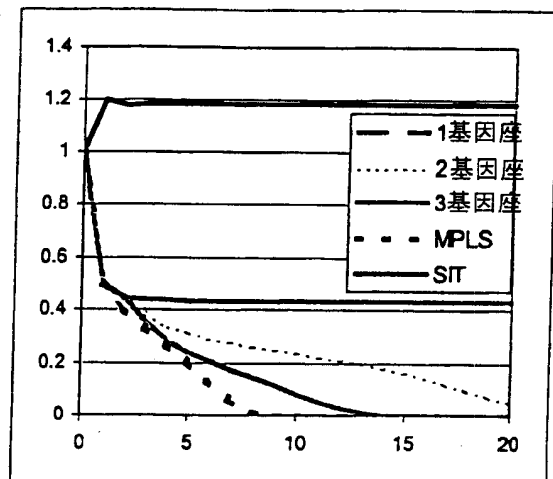


图 7b

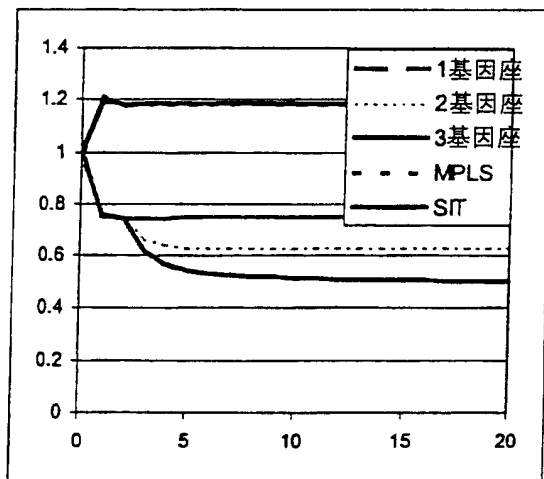


图 7c

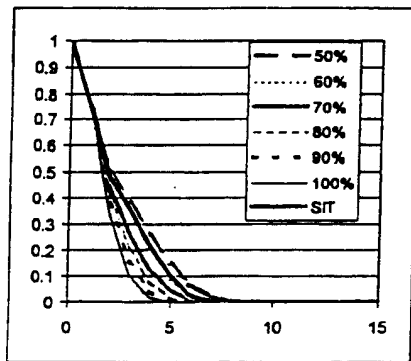


图 8a

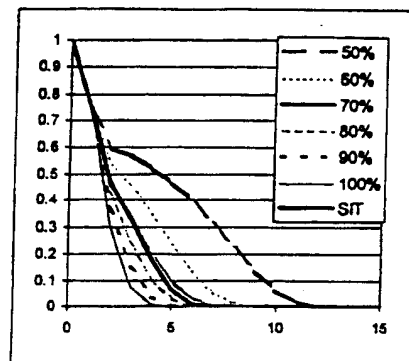


图 8b

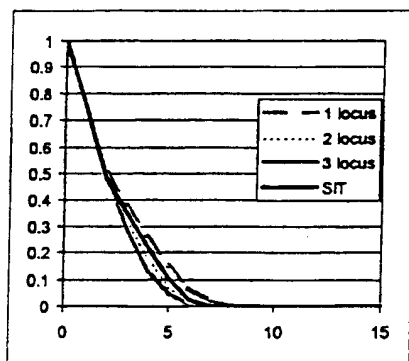


图 8c

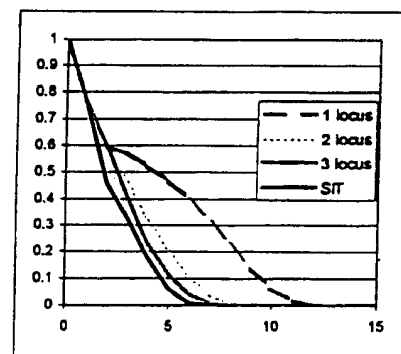


图 8d

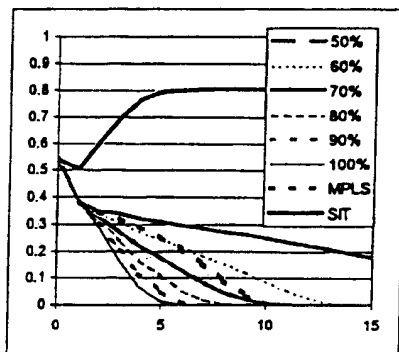


图 8e

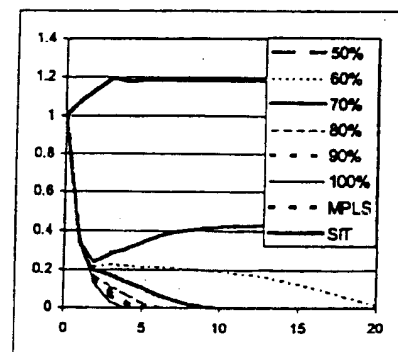


图 8f

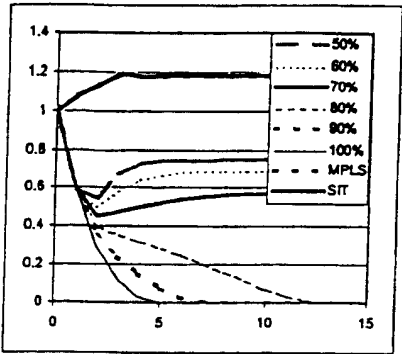


图 8g

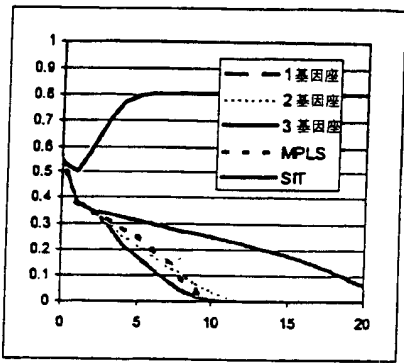


图 8h

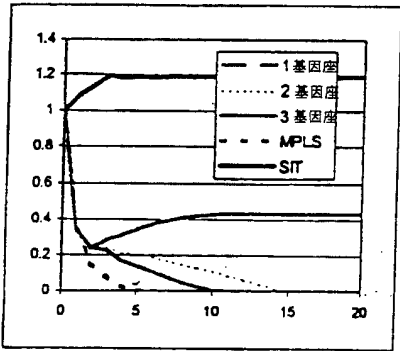


图 8i

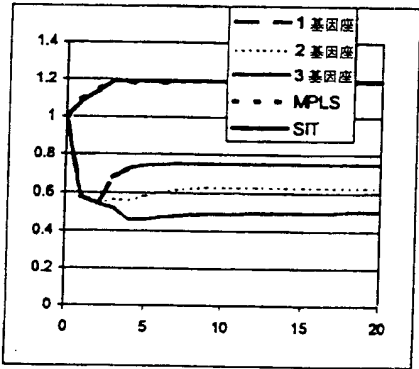


图 8j