

# 基于大肠杆菌HT115合成dsRNA杀菌剂前体物质的研究

张映瞳<sup>1</sup>, 赵欢欢<sup>2</sup>, 周宏胜<sup>1</sup>, 凌军<sup>1</sup>, 李鹏霞<sup>1,2,3\*</sup>

(1. 江苏省农业科学院 农业设施与装备研究所, 江苏 南京 210095; 2. 南京农业大学 食品科技学院, 江苏 南京 210095; 3. 江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室, 江苏 南京 210095)

**摘要:** 喷雾诱导基因沉默(spray-induced gene silencing, SIGS)基于RNA干扰(RNA interference, RNAi),在体外合成靶标双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA)并施用在附着病原菌的果蔬表面,通过dsRNA的跨界转运和对同源信使RNA(messenger RNA, mRNA)的特异性降解,实现对靶标基因的沉默,在果蔬采后病害防治领域具有很大潜力。但目前dsRNA的体外合成通常采用商业化的试剂盒,价格十分昂贵,阻碍了dsRNA杀菌剂的大规模应用。该文以工程菌-大肠杆菌HT115为宿主,建立能够合成靶向桃采后软腐病菌(匍枝根霉) $\beta$ -1,3-葡聚糖合成酶dsRNA的合成体系,可实现靶标dsRNA的低成本量产。

**关键词:** RNA干扰;喷雾诱导基因沉默(SIGS);双链RNA(dsRNA)杀菌剂;dsRNA合成;大肠杆菌

## Synthesis of dsRNA Fungicide Precursors Based on *Escherichia coli* HT115

ZHANG Ying-tong<sup>1</sup>, ZHAO Huan-huan<sup>2</sup>, ZHOU Hong-sheng<sup>1</sup>, LING Jun<sup>1</sup>, LI Peng-xia<sup>1,2,3\*</sup>

(1. Institute of Facilities and Equipment in Agriculture, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210095, Jiangsu, China; 2. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China; 3. Jiangsu Key Laboratory for Horticultural Crop Genetic Improvement, Nanjing 210095, Jiangsu, China)

**Abstract:** Spray-induced gene silencing (SIGS) based on RNA interference (RNAi) could be a potential strategy to control disease in fruits and vegetables after harvest. Target double-stranded RNA (dsRNA) was synthesized *in vitro* and applied to the surface of fruits and vegetables using SIGS. The dsRNA would then undergo transboundary transport, leading to specific degradation of homologous mRNAs and subsequent silencing of the target genes. However, *in vitro* synthesis of dsRNA usually requires the use of very expensive commercial kits, and this restricts large-scale application of dsRNA fungicides. The engineering bacterium *Escherichia coli* HT115 was used as a host to synthesize dsRNA that targets  $\beta$ -1,3-glucan synthetase of the soft rot pathogen *Rhizopus stolonifer* that affects peaches post-harvest. This method would allow the low-cost mass production of targeted dsRNA, thus providing a foundation for the development and application of dsRNA fungicides for post-harvest soft rot disease in peaches.

**Key words:** RNA interference; spray-induced gene silencing (SIGS); double-stranded RNA (dsRNA) fungicide; dsRNA synthesis; *Escherichia coli*

引文格式:

张映瞳,赵欢欢,周宏胜,等.基于大肠杆菌HT115合成dsRNA杀菌剂前体物质的研究[J].食品研究与开发,2022,43(9):186-191.

ZHANG Yingtong, ZHAO Huanhuan, ZHOU Hongsheng, et al. Synthesis of dsRNA Fungicide Precursors Based on *Escherichia coli* HT115[J]. Food Research and Development, 2022, 43(9): 186-191.

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金(CX(19)3113);江苏省自然科学基金青年基金(BK20190265)

作者简介:张映瞳(1988—),女(汉),助理研究员,博士,研究方向:果蔬贮藏保鲜。

\* 通信作者:李鹏霞(1976—),女,研究员,博士,研究方向:果蔬保鲜与加工。

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是一项在动植物、真菌和线虫等真核生物中保守存在的基因表达调控机制<sup>[1]</sup>。主要通过核酸序列特异性的相互作用抑制靶标基因表达,是真核生物预防病毒侵染、阻止转座子等外来核酸入侵,以及调控基因表达的重要防御机制<sup>[2]</sup>。基于这一原理, RNAi 现在已经普遍应用于基因功能分析和基因治疗等领域<sup>[3-5]</sup>。近年来,通过 RNAi 抑制功能基因表达防治植物病虫害和真菌性病害成为可能<sup>[6-8]</sup>,这也为果蔬采后真菌性病害的防治开辟了新的途径<sup>[9]</sup>。喷雾诱导基因沉默(spray-induced gene silencing, SIGS)是一种基于 RNAi,在体外合成靶标双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA)并喷洒在附着病原菌的果蔬表面后,通过 dsRNA 的跨界转运和对靶标基因的转录抑制实现防治病原菌的方法<sup>[10]</sup>。该方法操作简便,不依赖于宿主遗传转化体系,主要成分为生物大分子 dsRNA,无毒无残留,在果蔬采后病害防治领域具有广阔的应用前景<sup>[10-11]</sup>。

在 SIGS 中,制备 dsRNA 的方法通常是分别转录合成正义和反义 RNA 序列,然后退火产生 dsRNA 片段,该方法流程复杂、耗费较大,获得的 dsRNA 质量也不高。商业化试剂盒如 MEGAscript Kit 和 Transcript T7 High Yied Transcription Kit 应运而生,但因为价格昂贵导致 dsRNA 合成成本过高,限制了 SIGS 在果蔬病害防治领域的大规模应用。低成本的微生物反应器(如大肠杆菌)操作简易且能在廉价的培养基上迅速繁殖,使 dsRNA 量产成为可能。大肠杆菌 HT115(DE3)是 RNaseIII 缺陷型菌株<sup>[12]</sup>,无法合成 RNaseIII 故能保持 dsRNA 完整性,是大规模制备 dsRNA 的理想菌株。另外,异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside, IPTG)可诱导 HT115 中 T7 RNA 聚合酶的合成,进而强力启动带有 T7 启动子的 RNAi 载体的表达<sup>[13]</sup>,大量合成靶标 dsRNA。

本研究以引起桃采后软腐病的匍枝根霉(*Rhizopus stolonifer*)为例,构建能够合成靶向  $\beta$ -1,3-葡聚糖合成酶( $\beta$ -1,3-glucan synthase, GS)的 RNAi 载体,并采用 IPTG 诱导 gs-dsRNA 的大量合成,为基于靶向  $\beta$ -1,3-葡聚糖合成酶的 dsRNA 绿色杀菌剂的开发奠定基础。以大肠杆菌为微生物反应器,大量合成特异性靶标 dsRNA 为未来 dsRNA 杀菌剂的规模化生产和应用提供了新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

菌株:匍枝根霉(*Rhizopus stolonifer*)、DH5 $\alpha$ 、RNA-

seIII 缺陷型大肠杆菌 HT115;江苏省农业科学院农产品贮藏保鲜实验室保藏。

质粒:克隆载体 pMD<sup>TM</sup>20-T Vector;宝生物工程有限公司;质粒 L4440:江苏省农业科学院农产品贮藏保鲜实验室保藏。

试剂:真菌 RNA 提取试剂盒:Omega Bio-Tek 公司;PrimeScript<sup>®</sup>cDNA 第一链合成试剂盒:宝生物工程有限公司;DP103 质粒提取试剂盒、DP214 DNA 纯化试剂盒:天根生化科技有限公司;D2500-01 琼脂糖凝胶回收试剂盒:北京索莱宝科技有限公司;限制性内切酶、T4 DNA 连接酶:赛默飞世尔科技公司。

### 1.2 仪器与设备

5424R 冷冻高速离心机、BioPhotometer Plus 核酸蛋白测定仪:Eppendorf 中国有限公司;EDC-810 PCR 扩增仪:北京东胜科技有限公司;JS-680D 凝胶成像仪:上海培清科技有限公司;SW-CJ-1B 超净工作台:苏州净化设备有限公司;420232 恒温培养箱:三洋电机株式会社;ZQTY-70V 振荡培养箱:上海知楚仪器有限公司;DW-HL678 超低温冰箱:中科美菱低温科技股份有限公司;UV-1000 紫外灯:上海嘉鹏科技有限公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 引物设计和 cDNA 的合成

##### 1.3.1.1 引物设计

根据美国国家生物信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)数据库中公布的匍枝根霉 gs 基因序列,采用 Oligo7 软件进行引物设计用于扩增 gs 基因的片段,上下游引物分别带有 Sall 和 NheI 酶切位点。引物序列见表 1。

表 1 聚合酶链式反应引物序列

Table 1 Sequence of primers for polymerase chain reaction

引物名称	引物序列 5'→3'
gs-F	CGGCTAGCTATGCCACCAAAGACTCAC
gs-R	CGGTCGACCTTCGGTCTGATCATAGAGATCC
M13-47	CGCCAGGGTTTCCCAGTCCACGC
RV-W	GAGCGGATAACAATTTCCACACAGG
SK-primer	TCTAGAACTAGTGGATC
KS-primer	CGAGGTCGACGGTATCC

注:下划线标注的为酶切位点 NheI 和 Sall。

##### 1.3.1.2 匍枝根霉 cDNA 合成

收集匍枝根霉菌体,添加液氮研磨。采用 RNA 提取试剂盒进行总 RNA 提取,分别使用琼脂糖凝胶电泳和 BioPhotometer Plus 核酸蛋白测定仪检测 RNA 的完

整性和浓度。使用 PrimeScript<sup>®</sup> 第一链合成试剂盒,对检测合格的 RNA 进行反转录,反应体系为 5×Prime-Script Buffer 2, 4.0 μL; PrimeScript RT Enzyme Mix I, 1.0 μL; RT Primer Mix, 1.0 μL; RNA, 10.0 μL; RNase Free dH<sub>2</sub>O, 补足至 20 μL。37 °C 孵育 15 min, 85 °C 孵育 5 s, 立即置于冰上。获得的 cDNA 于 -80 °C 保存。

### 1.3.2 L4440-gs 大肠杆菌表达体系构建

#### 1.3.2.1 目的片段的扩增

以 cDNA 第一链为模板,使用 1.3.1.1 中设计的引物 gs-F 和 gs-R, 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增目的基因片段。反应体系为 2×Phanta Master Mix: 25 μL; 上游引物: 2 μL; 下游引物: 2 μL; 模板: 1 μL; ddH<sub>2</sub>O: 20 μL。PCR 反应程序: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s; 58 °C 退火 30 s; 72 °C 延伸 30 s; 30 个循环, 72 °C 补充延伸 2 min。

通过琼脂糖凝胶电泳检验 PCR 产物的大小,在紫外灯下切下大小正确目的片段进行胶回收。首先根据胶条的质量加入 Binding Buffer, 60 °C 水浴 10 min; 将溶胶液转移至吸附柱, 10 000×g 离心 1 min, 丢弃收集管中液体; 加入 500 μL wash buffer 至吸附柱, 10 000×g 离心 1 min, 弃滤液; 重复上一步骤; 12 000×g 空转 2 min, 弃收集管; 将吸附柱置于新的 1.5 mL 离心管中, 在吸附膜上方悬空滴加 50 μL 无菌水, 室温 (22 ± 1) °C 放置 2 min, 12 000×g 离心 1 min; 取 1 μL DNA, 检测浓度。

#### 1.3.2.2 克隆载体的构建

将回收后的目的片段与 T 载体 pMD<sup>™</sup>20-T Vector 按照摩尔比 1:3 进行混合, 16 °C 过夜连接。连接体系为 pMD<sup>™</sup>20-T Vector 1.0 μL; 目的片段 2.0 μL; dH<sub>2</sub>O 3.0 μL; Solution I 溶液 5.0 μL。

取连接液 5 μL 转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中, 具体步骤如下: 取大肠杆菌 DH5α 感受态细胞置于冰上; 加入连接产物, 用枪轻柔吹吸混匀, 冰浴 30 min; 迅速置于 42 °C 水浴锅中热击 90 s, 转移至冰上静置 2 min; 添加 800 μL LB 液体培养基, 37 °C 下 200 r/min 复苏 1 h; 4 000×g, 离心 5 min, 吸出 800 μL 上清; 剩余菌液用移液器吹吸均匀, 涂布于 LB 固体培养基上 (氨苄青霉素 Amp 终浓度 100 μg/mL, IPTG 浓度 50 mg/mL, 5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷 (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactopyranoside, X-Gal) 浓度 20 mg/mL); 倒置培养皿, 37 °C 培养 16 h~18 h 后进行蓝白斑筛选。挑取白色单菌落接种至 LB 液体培养基 (Amp<sup>+</sup>) 37 °C 振荡培养 12 h~16 h。吸取 1 μL 菌液进行 PCR 鉴定, 使用的引物为 pMD<sup>™</sup>20-T Vector 通用引物 M13-47 和 RV-W。检验正确的送公司测序进

行进一步鉴定。

#### 1.3.2.3 L4440-gs 重组菌的构建

将测序正确的重组质粒和 L4440 干扰载体分别使用 NheI 和 SalI 进行酶切, 酶切体系为 10×Buffer, 5 μL; DNA, 约 2.5 μg; 限制性内切酶, 2 μL; ddH<sub>2</sub>O, 补足至 50 μL。37 °C 孵育约 3 h~4 h。

琼脂糖凝胶电泳分离目的片段, 采用 T4 DNA 连接酶将回收后的目的基因片段和 L4440 干扰载体按物质的量之比 1:3 在 22 °C 过夜连接。反应体系为 10×Buffer, 2 μL; 目的片段, 4 μL; L4440 载体, 6 μL; T4 Ligase, 1 μL; ddH<sub>2</sub>O, 补足至 20 μL。

将连接产物转化至 RNaseIII 缺陷型大肠杆菌 HT115 (DE3) 感受态细胞中, 涂布于添加氨苄青霉素和四环素 Tet (50 μg/mL) 的 LB 固体培养基上, 37 °C 培养 12 h~16 h。挑取阳性单克隆接种至 LB 液体培养基 (Amp<sup>+</sup>, Tet<sup>+</sup>), 37 °C 振荡培养 12 h~16 h。提取重组质粒, 使用通用引物 SK-primer 和 KS-primer 进行 PCR 验证。验证正确的质粒继续使用 XmnI, 以及 NaeI 和 StuI 分别进行单酶切和双酶切验证。根据酶切后片段大小判断质粒构建是否正确。将验证正确的重组质粒送公司进一步测序鉴定。质粒构建流程演示图见图 1。

### 1.3.3 L4440-gs dsRNA 的诱导表达

#### 1.3.3.1 IPTG 诱导

将 1.3.2.3 中获得的 L4440-gs 重组大肠杆菌接种至添加 Amp<sup>+</sup> 和 Tet<sup>+</sup> 的 LB 液体培养基中 37 °C 振荡培养 12 h~16 h。将培养好的菌液按照 1:100 的体积比扩大培养, 当 OD<sub>600</sub> 值约为 0.5 时加入 IPTG 使其终浓度为 0.4 mmol/L。继续振荡培养 4 h~5 h 以诱导 L4440-gs dsRNA 的合成。

#### 1.3.3.2 L4440-gs dsRNA 的提取

收集 1.3.3.1 中获得的菌液, 置于 80 °C 烘箱 20 min 后, 10 000×g 离心 5 min 获得菌体。采用细菌 RNA 提取试剂盒从获得的菌体中提取总 RNA: 加 180 μL TE buffer (20 μL 50 mg/mL 裂解酶) 重悬菌体, 30 °C 孵育 10 min; 加入 350 μL buffer BRK/2-ME 和 25 mg~40 mg 玻璃粉, 充分振荡, 离心 5 min; 取 400 μL 上清置于 1.5 mL 离心管, 加 70% 酒精于溶菌产物中, 吹吸混匀; 将样品加入吸附柱中, 10 000×g 离心 30 s, 弃滤液; 加入 300 μL RNA wash buffer I, 10 000×g 离心 30 s, 弃滤液, 重复两次; 加入 500 μL RNA wash buffer II, 10 000×g 离心 30 s, 弃滤液, 重复两次; 10 000×g 空甩 2 min; 将吸附柱置于新的 1.5 mL 离心管中, 加入 50 μL 焦炭酸二乙酯 (diethyl pyrocarbonate, DEPC) 水, 10 000×g 离心 30 s, 得到 RNA。向总 RNA 中添加 RNaseA 酶 (1.0 μg/mL),

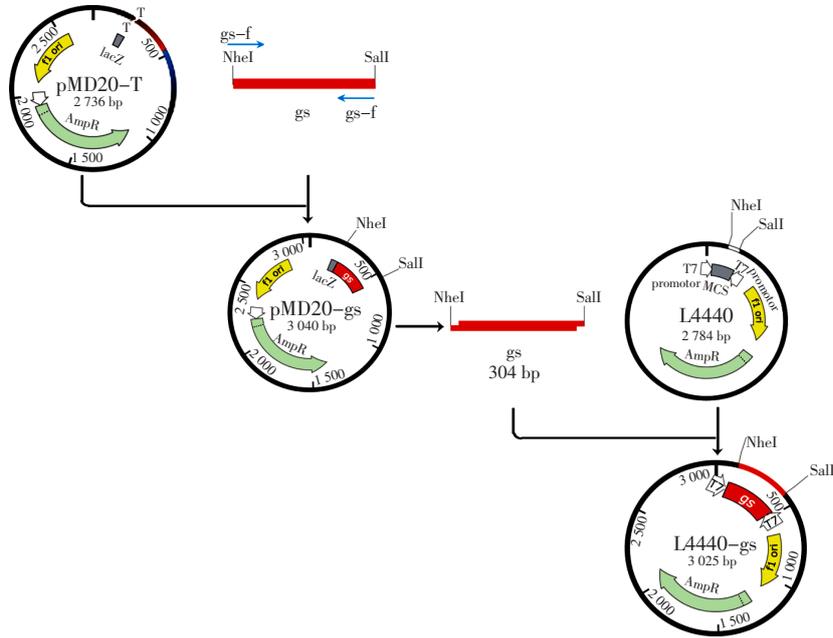


图1 L4440-gs质粒构建流程图

Fig.1 Flow chart of construction of L4440-gs plasmid

37 °C 孵育 1 h, 以去除总 RNA 中的单链 RNA。使用三氯甲烷抽提 dsRNA 并用等体积异丙醇沉淀、75%乙醇洗涤, 并用 DEPC 水溶解, 分别使用琼脂糖凝胶电泳和 BioPhotometer Plus 核酸蛋白测定仪检测 dsRNA 的大小和浓度。获得的 dsRNA 保存于 -80 °C。

### 1.3.3.3 L4440-gs dsRNA 的鉴定

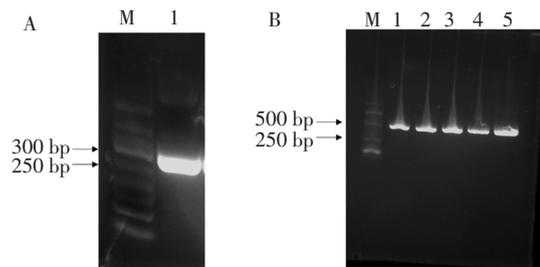
分别使用 DNase I 和 RNaseA 酶分别对 dsRNA 进行酶解, 并提取 HT115 菌株的总 RNA 为对照。酶解反应体系分别为 10×DNase I buffer: 1.0 μL; DNase I (1 U/μL): 1.0 μL; dsRNA: 1.0 μL, ddH<sub>2</sub>O: 7.0 μL。37 °C 下孵育 30 min; 或 10×DNase I buffer: 1.0 μL; DNase I (1 U/μL): 1.0 μL; dsRNA: 1.0 μL, ddH<sub>2</sub>O: 7.0 μL。37 °C 孵育 30 min; RNaseA (1.0 μg/mL): 0.75 μL; dsRNA: 1.0 μL; ddH<sub>2</sub>O: 4.0 μL; 1 mmol/L NaCl: 5.75 μL。37 °C 下孵育 1 h。

## 2 结果与分析

### 2.1 gs 基因片段的克隆

在选择目的片段时应尽量避免基因的保守区域, 以防与果蔬对应基因具有较高同源性, 从而造成对果蔬相关基因的抑制。通过同源性比对, 选择 gs 基因中的非保守区域 (559 bp~851 bp) 片段作为目的片段。以匍枝根霉 cDNA 为模板, 使用引物 gs-F 和 gs-R 扩增该片段, 得到 300 bp 左右大小条带, 如图 2A 所示。

由图 2 可知, 条带大小符合预期, 切胶回收后连接至 pMD™20-T 载体。挑取白色菌落, 采用 pMD™20-T 载体上的通用引物 M13-47 和 RV-WPCR 进行菌落



M. DM2000 Marker; A1. 两端带有 NheI 和 Sall 酶切位点的 gs 基因片段的 PCR 产物; B1~B5. 克隆载体 PCR 验证产物。

图2 gs 基因片段的扩增结果和克隆载体 pMD20T-gs 的 PCR 鉴定结果

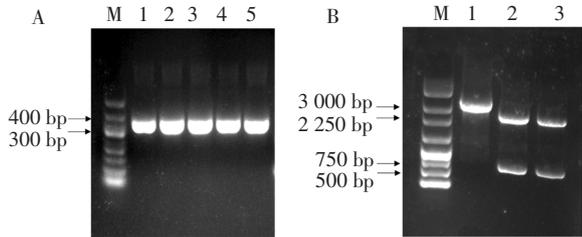
Fig.2 Amplification result and PCR verification of gs gene fragment

PCR 验证, 得到 500 bp 左右条带 (图 2B), 与预期一致。将菌液送公司测序, 序列比对结果表明目的片段已成功克隆。

### 2.2 L4440-gs 重组载体的鉴定

借助克隆载体 pMD20T-gs 中 gs 基因片段两侧以及 L4440 干扰载体多克隆位点中的 NheI 和 Sall 进行双酶切, 通过电泳分离和胶回收得到各自片段, 再使用 T4 DNA 连接酶将 gs 基因片段和 L4440 载体进行连接。转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞后涂布于 LB 平板 (Amp<sup>+</sup>Tet<sup>+</sup>), 挑取白色菌落进行菌落 PCR 验证, 结果如图 3 所示。

由图 3 可知, PCR 扩增得到的片段大小约为 400 bp 左右, 与预期一致。进一步使用内切酶进行酶切验证,



M为DM2000 Marker;A1~A5.L4440-gs重组载体的PCR产物;B1为XmnI单酶切结果;B2~B3为StuI和NaeI双酶切结果。

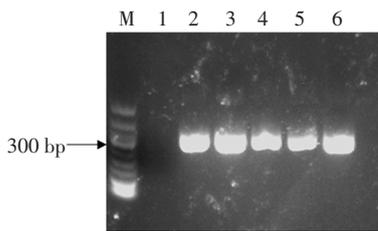
图3 L4440-gs重组载体的PCR和酶切验证结果

Fig.3 PCR and digestion verification of L4440-gs recombinant plasmid

当使用 XmnI 单酶切时得到 3 000 bp 左右条带;当使用 StuI 和 NaeI 进行双酶切后分别得到 550 bp 和 2 500 bp 左右大小的片段,与预期一致。将酶切正确的重组质粒送公司测序,结果进一步证实 gs 基因片段已成功连接至 L4440 干扰载体中。

### 2.3 HT115-L4440-gs 重组菌的构建及 dsRNA 的诱导表达

将 2.2 中获得的 L4440-gs 重组质粒转化至 RNaseIII 缺陷型的大肠杆菌 HT115(DE3)感受态细胞中,经筛选鉴定得到重组菌,菌液 PCR 鉴定结果见图 4。



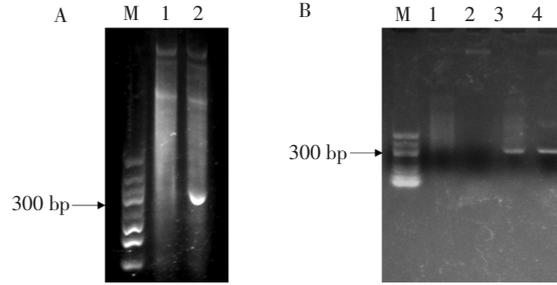
M.DM2000 Marker;1.阴性对照;2~6.重组菌。

图4 HT115-L4440-gs重组菌的菌液PCR验证

Fig.4 PCR verification of HT115-L4440-gs recombinant

将重组菌接种至 5 mL LB 液体培养基(Amp<sup>+</sup>Tet<sup>+</sup>)中,并进行扩大培养,加入 IPTG 诱导后继续振荡培养 4 h~5 h 以诱导 L4440-gs dsRNA 的合成。收集菌体后提取总 RNA,然后进行琼脂糖凝胶电泳检测,结果见图 5。

由图 5 可知,重组菌中的 dsRNA 正确表达,大小与预期一致。以 HT115 总 RNA 为对照,使用 DNaseI 和 RNase A 对 dsRNA 进行消化处理,结果发现 dsRNA 条带亮度没有发生明显变化,而 HT115 总 RNA 在经 RNase A 处理后完全降解,而两种样品经 DNaseI 处理后基因组条带也全部降解,进一步证实了提取得到的 300 bp 左右的核酸分子主要为 dsRNA,不是 RNA 或



M.DM2000 Marker;A.处理 HT115 总 RNA 结果;A1.未经 IPTG 诱导;A2.IPTG 诱导;B1.DNaseI 处理 HT115 总 RNA 结果;B2.RNase;B3.DNaseI 处理 dsRNA 结果;B4.RNase A 处理 dsRNA 结果。

图5 L4440-gs dsRNA 的诱导表达及鉴定

Fig.5 Induced expression of L4440-gs dsRNA and digestion results of gs dsRNA with DNaseI and RNase A

者 DNA。但实际上,经 RNase A 酶消化处理后仍然存在少部分核糖体 RNA,因此想要获得完全纯净的 dsRNA 还需进行进一步纯化,这与张涛<sup>[14]</sup>、陈瑶<sup>[15]</sup>和包文化<sup>[16]</sup>的研究结果相似。这意味着 dsRNA 的纯化是未来基于工程菌合成 dsRNA 产业化中有待解决的关键问题之一,但不完全纯净的 dsRNA 并不影响使用杀菌效果,只是在评价 dsRNA 效价时存在一定障碍。

### 3 讨论与结论

本研究建立了基于工程菌的桃软腐病菌(匍枝根霉)靶标基因 dsRNA 的合成体系,可实现靶标 dsRNA 的低成本量产,为 RNAi 杀菌剂的研发和应用奠定了基础,推动了以 RNAi 为核心的果蔬采后真菌性病害防治技术的发展。但 dsRNA 的体外稳定性较低是值得我们关注的问题。dsRNA 属于生物大分子,易降解,作为杀菌剂使用时,从安全性和环保性角度来说可以实现无毒无残留,但提高 dsRNA 的稳定性可有效延长 dsRNA 杀菌剂的有效期,提高对果蔬产品在恶劣环境下的长效保护机制<sup>[17]</sup>。有研究表明纳米材料包埋可有效提高核苷酸的稳定性<sup>[18]</sup>,同时纳米材料作为载体可以携带核苷酸进入细胞内部,提高 dsRNA 对病原菌的渗透性,有助于 dsRNA 进入病原菌体内发挥作用<sup>[19-20]</sup>。因此原核表达 dsRNA 结合纳米材料提高 dsRNA 的稳定性和渗透率是未来重要的研究方向。同时,对原核表达系统进行改造和优化,进一步提高表达水平提高 dsRNA 产量,以及建立多靶标 dsRNA 合成体系,实现多靶标抑制也是重要的攻关方向。

### 参考文献:

[1] FLYNT A S. Insecticidal RNA interference, thinking beyond long

- dsRNA[J]. *Pest Management Science*, 2021, 77(5): 2179–2187.
- [2] FIRE A, XU S, MONTGOMERY M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Nature*, 1998, 391(6669): 806–811.
- [3] KIM J, BADALONI A, WILLERT T, et al. An RNAi-based approach to down-regulate a gene family *in vivo*[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e80312.
- [4] TAKAHASHI Y, NISHIKAWA M, TAKAKURA Y. Nonviral vector-mediated RNA interference: Its gene silencing characteristics and important factors to achieve RNAi-based gene therapy[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2009, 61(9): 760–766.
- [5] KAMATH R S, FRASER A G, DONG Y, et al. Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi[J]. *Nature*, 2003, 421(6920): 231–237.
- [6] MAMTA B, RAJAM M V. RNAi technology: A new platform for crop pest control[J]. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2017, 23(3): 487–501.
- [7] CAGLIARI D, DIAS N P, GALDEANO D M, et al. Management of pest insects and plant diseases by non-transformative RNAi[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 1319.
- [8] LIU S S, JAOUANNET M, DEMPSEY D A, et al. RNA-based technologies for insect control in plant production[J]. *Biotechnology Advances*, 2020, 39: 107463.
- [9] KOCH A, BIEDENKOPF D, FURCH A, et al. An RNAi-based control of *Fusarium graminearum* infections through spraying of long dsRNAs involves a plant passage and is controlled by the fungal silencing machinery[J]. *PLoS Pathogens*, 2016, 12(10): e1005901.
- [10] KOCH A, HÖFLE L, WERNER B T, et al. SIGS vs HIGS: A study on the efficacy of two dsRNA delivery strategies to silence *Fusarium FgCYP51* genes in infected host and non-host plants[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2019, 20(12): 1636–1644.
- [11] WANG M, THOMAS N, JIN H L. Cross-kingdom RNA trafficking and environmental RNAi for powerful innovative pre- and post-harvest plant protection[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2017, 38: 133–141.
- [12] NIÑO-SÁNCHEZ J, CHEN L H, DE SOUZA J T, et al. Targeted delivery of gene silencing in fungi using genetically engineered bacteria[J]. *Journal of Fungi* (Basel, Switzerland), 2021, 7(2): 125.
- [13] RIO D C. Expression and purification of active recombinant T7 RNA polymerase from *E. coli*[J]. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2013, 2013(11): 078527.
- [14] 张涛. 原核表达的 dsRNA 诱导番木瓜畸形花叶病毒抗性的研究[D]. 海口: 海南大学, 2014: 33–34.
- ZHANG Tao. A study on resistance to PLDMV induced by dsRNA of prokaryotic expression[D]. Haikou: Hainan University, 2014: 33–34.
- [15] 陈瑶. 原核表达的 dsRNA 抗番木瓜环斑病毒的研究[D]. 海口: 海南大学, 2012: 36–37.
- CHEN Yao. dsRNA of prokaryotic expression for resistance to papaya ringspot virus[D]. Haikou: Hainan University, 2012: 36–37.
- [16] 包文化. 细菌表达 dsRNA 和寄主表达 hairpin dsRNA 介导的玉米黏虫 chitinase 基因的 RNA 干扰研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2017.
- BAO Wenhua. Bacterial expression of dsRNA and host expression of hairpin dsRNA-mediated RNA interference on *Mythimna separata* chitinase gene[D]. Hohhot: Inner Mongolia University, 2017.
- [17] WANG M, WEIBERG A, LIN F M, et al. Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection[J]. *Nature Plants*, 2016, 2: 16151.
- [18] MITTER N, WORRALL E A, ROBINSON K E, et al. Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses[J]. *Nature Plants*, 2017, 3: 16207.
- [19] ZHENG Y, HU Y S, YAN S, et al. A polymer/detergent formulation improves dsRNA penetration through the body wall and RNAi-induced mortality in the soybean aphid *Aphis glycines*[J]. *Pest Management Science*, 2019, 75(7): 1993–1999.
- [20] ZHANG X, ZHANG J, ZHU K Y. Chitosan/double-stranded RNA nanoparticle-mediated RNA interference to silence chitin synthase genes through larval feeding in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*)[J]. *Insect Molecular Biology*, 2010, 19(5): 683–693.

加工编辑:张璐

收稿日期:2021-05-19