

崔苗苗, 杨行洲, 宋海艳, 等. 水稻干尖线虫海藻糖 6-磷酸合成酶基因双链 RNA 细菌表达体系构建[J]. 江苏农业学报, 2025, 41(5): 867-874.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2025.05.005

# 水稻干尖线虫海藻糖 6-磷酸合成酶基因双链 RNA 细菌表达体系构建

崔苗苗<sup>1,2</sup>, 杨行洲<sup>1,2</sup>, 宋海艳<sup>1,2</sup>, 魏利辉<sup>2</sup>, 顾爱国<sup>3</sup>, 乐秀虎<sup>1</sup>, 李东霞<sup>1</sup>, 冯 辉<sup>2</sup>

(1. 河北工程大学园林与生态工程学院, 河北 邯郸 056038; 2. 江苏省农业科学院植物保护研究所, 江苏 南京 210014; 3. 江苏省产品质量监督检验研究院, 江苏 南京 210007)

**摘要:** 外源双链 RNA(dsRNA)可通过 RNA 干扰(RNAi)影响植物线虫的基因表达,达到杀虫防病的目的。利用细菌表达系统进行 dsRNA 制备,生产效率高、成本低,是 dsRNA 规模化制备的优选策略。为探索基于 RNAi 技术的细菌表达 dsRNA 在水稻干尖线虫(*Aphelenchoides besseyi*)防治中的作用,本研究以水稻干尖线虫海藻糖 6-磷酸合成酶基因 *AbTSP1* 和 *AbTSP2* 为靶标基因,设计构建细菌表达双链 RNA(dsAbTSP1、dsAbTSP2)载体并转化大肠杆菌 HT115(DE3),优化 dsRNA 诱导表达条件和提取方法,并利用荧光定量 PCR 测定细菌表达的 dsRNA 对靶标基因的沉默效率,评估其在水稻干尖线虫的防治效果。结果表明,当异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)浓度为 0.5 mmol/L、诱导时间为 6 h,本研究构建的携带 *AbTSP-L4440* 表达载体 HT115 菌株的 dsRNA 产量达到最大。利用 Trizol 法和甲酰胺法从表达菌株中提取的 dsRNA 产量显著高于乙醇-氯化钠法。用 dsAbTSP1 和 dsAbTSP2 处理水稻干尖线虫后,靶基因 *AbTSP1* 和 *AbTSP2* 表达水平下调,在 4 °C 低温、40 °C 高温及脱水干燥环境中水稻干尖线虫存活率均显著低于 M9 缓冲液处理和 dsGFP 处理。本研究成功构建了水稻干尖线虫 *AbTSP1*、*AbTSP2* 基因的 dsRNA 细菌表达体系,获得的 dsRNA 具有明显的 RNAi 效应,为利用 RNA 农药防治水稻干尖线虫提供了技术支撑。

**关键词:** 水稻干尖线虫; 海藻糖-6 磷酸合成酶基因; 双链 RNA; RNA 干扰

**中图分类号:** S435.111.4<sup>+</sup>8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2025)05-0867-08

## Construction of a bacterial double-stranded RNA expression system targeting the trehalose-6-phosphate synthase genes of *Aphelenchoides besseyi*

CUI Miaomiao<sup>1,2</sup>, YANG Xingzhou<sup>1,2</sup>, SONG Haiyan<sup>1,2</sup>, WEI Lihui<sup>2</sup>, GU Aiguo<sup>3</sup>, LE Xiuhu<sup>1</sup>, LI Dongxia<sup>1</sup>, FENG Hui<sup>2</sup>

(1. School of Landscape and Ecological Engineering, Hebei University of Engineering, Handan 056038, China; 2. Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 3. Jiangsu Product Quality Testing & Inspection Institute, Nanjing 210007, China)

**Abstract:** Exogenous double-stranded RNA (dsRNA) can affect the gene expression of plant nematodes through

收稿日期: 2024-09-30

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目[ CX(22)3017 ]; 河北省研究生创新资助项目( CXZZBS2024158 ); 邯郸市科学技术研究与发

展计划项目( 21422012329 )

作者简介: 崔苗苗( 1992- ), 女, 河北邯郸人, 硕士研究生, 主要从事线虫防治研究。( E-mail ) cuimiao0000@163.com

通讯作者: 乐秀虎, ( E-mail ) lexihu@163.com; 冯 辉, ( E-mail ) fenghui@jaas.ac.cn

RNA interference (RNAi) to achieve the purpose of pest control. The use of bacterial expression system for dsRNA preparation has high production efficiency and low cost, which is the preferred strategy for large-scale preparation of dsRNA. In order to explore the role of bacterial dsRNA expression based on RNAi technology in the control of *Aphelenchoides besseyi*, in this study, the trehalose-6-phosphate synthase genes *AbTSP1* and *AbTSP2* of *Aphelenchoides bes-*

*seyi* were used as target genes to design and construct bacterial expression double-stranded RNA (dsAbTPS1 and dsAbTPS2) vectors and transform *Escherichia coli* HT115 (DE3). The induction expression conditions and extraction methods of dsRNA were optimized, and the silencing efficiency of dsRNA expressed by bacteria on target genes was determined by fluorescence quantitative PCR, and the control effect of dsRNA on *Aphelenchoides besseyi* was evaluated. The results showed that when the concentration of isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG) was 0.5 mmol/L and the induction time was 6 h, the dsRNA yield of the *AbTPS*-L4440 expression vector HT115 strain constructed in this study reached the maximum. The yield of dsRNA extracted from the expression strains using Trizol method and formamide method was significantly higher than that obtained using ethanol-sodium chloride method. After treating *Aphelenchoides besseyi* with dsAbTPS1 and dsAbTPS2, the expression levels of target genes *AbTPS1* and *AbTPS2* were down-regulated. The survival rate of *Aphelenchoides besseyi* under low temperature of 4 °C, high temperature of 40 °C and dehydration and drying conditions was significantly lower than that in M9 buffer treatment and dsGFP treatment. In this study, the bacterial dsRNA expression system targeting *AbTPS1* and *AbTPS2* of *A. besseyi* was successfully constructed, and the obtained dsRNA exhibited obvious RNAi effects, which provided technical support for the use of RNA-based pesticides to control *A. besseyi*.

**Key words:** *Aphelenchoides besseyi*; trehalose-6-phosphate synthase genes; double stranded RNA; RNA interference

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是一种进化上保守的序列特异机制,能调控大部分真核生物基因表达。一般而言,内源或外源双链 RNA (dsRNA) 被加工成 18 ~ 30 nt 的小 RNA,包括小干扰 RNA (siRNA) 和微小 RNA (miRNA)。这些小 RNA 可识别互补的 mRNA 或 DNA,通过切割 mRNA 和抑制翻译、DNA 甲基化和染色质修饰等,在转录时或转录后调控基因表达<sup>[1]</sup>。由于 dsRNA 具有低毒、环境友好以及容易设计等特点,因此,基于 RNAi 技术,利用 dsRNA 进行植物病虫害防治得到越来越多的关注<sup>[2]</sup>。

大量高效制备 dsRNA 或小 RNA 是 RNAi 防治策略得到应用的关键步骤。基于细菌体系生产 dsRNA,制备简便且成本低廉,是 dsRNA 规模化制备的优选策略。目前的研究中通常将靶标基因序列构建进入 RNAi 载体,转化至中性、共生或有益细菌,通过优化发酵条件,提取发酵产物中的 dsRNA,从而实现 dsRNA 的量产<sup>[2-3]</sup>。当前应用较多的细菌表达体系是大肠杆菌 HT115 (DE3)<sup>[4-6]</sup>。HT115 (DE3) 菌株缺乏核酸内切酶 RNAase III 基因,从而避免细胞产生的 dsRNA 降解。此外,HT115 (DE3) 菌株在异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导下可产生 T7 聚合酶,因此通过构建带有 T7 启动子的 RNAi 载体 (如 L4440 等) 可实现 dsRNA 的大量合成<sup>[3,7]</sup>。但目前有关发酵条件及提取方法对细菌体系 dsRNA 产量的影响研究较少。

水稻干尖线虫 (*Aphelenchoides besseyi*) 是水稻重要病原线虫之一,被列入世界十大植物病原线虫名

单<sup>[8]</sup>。干尖线虫为害水稻时,水稻植株常出现剑叶叶尖干枯或小穗头等症状,导致穗长缩短、穗粒数减少以及稻米品质变差,对水稻安全生产造成严重威胁<sup>[9]</sup>。水稻干尖线虫是典型的外寄生线虫,主要为害水稻地上部分生组织,在孕穗期进入颖花,随着种子成熟停止取食,藏匿米粒和颖壳之间进入脱水休眠状态,并依赖种子实现远距离传播<sup>[10]</sup>。基于上述寄生特点,水稻干尖线虫能适应高温、干燥、高渗透等多种逆境胁迫。

随着分子生物学研究的深入,作物响应逆境胁迫的海藻糖-6 磷酸合成酶 (Trehalose-6-phosphate synthase, TPS) 基因等相继被克隆和分析<sup>[10-11]</sup>。海藻糖是生物体的血糖,经水解为生物体提供能量,而 TPS 是昆虫、线虫及病原菌海藻糖合成途径中的关键酶,广泛参与微生物的生长发育、侵染寄生及其对逆境胁迫响应与适应等过程<sup>[12]</sup>。*RdTPS1* 基因对谷蠹 (*Rhyzopertha dominica*) 适应热逆境至关重要,通过 dsRNA 处理能显著降低谷蠹体内海藻糖水平及其在高温胁迫下的存活率<sup>[13]</sup>。水稻褐飞虱 (*Nilaparvata lugens*) TPS 基因在不同发育阶段差异化表达,基于 RNAi 技术可抑制 TPS3 基因的表达水平,进而造成褐飞虱蜕皮障碍和翅发育畸形<sup>[14]</sup>。水稻稻瘟病原菌 (*Maganaphorthe oryzae*) *MoTPS1* 基因还可调控病原菌的侵染和致病性<sup>[15]</sup>。Chen 等<sup>[11]</sup>鉴定了 2 个水稻干尖线虫 TPS 基因 (*AbTPS1* 和 *AbTPS2*),体外合成 dsRNA 证实这 2 个基因对线虫在低氧胁迫逆境中的存活和代谢非常重要,并有望成为水稻干尖线虫防治的靶标。因此,本研究拟通过构建携

带 *AbTPS* 基因的 RNAi 载体,利用 IPTG 诱导大肠杆菌 HT115 (DE3) 表达制备 dsRNA,并评估其应用效果,为基于 RNAi 策略防治水稻干尖线虫提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 线虫准备

本研究所采用水稻干尖线虫种群最初分离自江苏省发病水稻病穗,后在灰葡萄孢菌 (*Botrytis cinerea*) 平板上扩繁培养。用无菌水洗脱平板进行线虫收集,并用含 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氨苄青霉素、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  卡那霉素和 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  两性霉素的消毒液对虫体进行消毒<sup>[16]</sup>。

### 1.2 线虫 RNA 提取和 cDNA 合成

收集活性良好的线虫,液氮速冻后迅速研磨成粉,加入 1 mL Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司产品),按照试剂盒说明书进行线虫 RNA 提取。利用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳及 Nanodrop 2000 分光光度计(美国 Thermo Scientific 公司产品)的  $OD_{260}/OD_{280}$

(260 nm 和 280 nm 的吸光度比值)进行 RNA 质量和产量评估。采用 *TransScript* uni one-step gDNA removal and cDNA synthesis superMix 试剂盒(北京全式金生物技术有限公司产品)进行 cDNA 合成。

### 1.3 靶标片段扩增

将水稻干尖线虫海藻糖-6 磷酸合成酶基因 cDNA 序列 (*AbTPS1*; NCBI 登录号 KY661388; *AbTPS2*; NCBI 登录号 KY661389) 上传 siRNA target finder 网站 (<https://www.genscript.com/tools/sirna-target-finder>), 设置水稻干尖线虫 (*A. besseyi*) 为靶标物种,含有 4 个及以上潜在 siRNA 的序列进行靶标序列分析。采用 Primer3 plus 网站 (<http://www.primer3plus.com/>) 设计引物,并用 Primer Blast 网站 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行特异性检验后,委托生工(上海)生物工程股份有限公司进行引物合成。分别以引物 *AbTPS1-F/AbTPS1-R* 和 *AbTPS2-F/AbTPS2-R* 扩增 *AbTPS1* 和 *AbTPS2* 序列片段,并连接至 pMD20-T 载体,测序正确的重组转化子提取质粒,用于后续研究。本研究所用引物序列见表 1。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in the study

引物名称	引物序列(5'→3')	引物用途
<i>AbTPS1-F</i>	TACATTGATGATGCGTTCTC	目标基因片段获取
<i>AbTPS1-R</i>	GACAACAGACATGACTTCTT	
<i>AbTPS2-F</i>	CGATTCTCCTCATTGGAC	
<i>AbTPS2-R</i>	AGTGCTGTGAATATGTGTTG	
<i>dsTPS1-F</i>	<u>GTGACGCGTGGATCCCCGGG</u> TACATTGATGATGCGTTCTC	RNAi 载体构建
<i>dsTPS1-R</i>	<u>GTCGACGGTATCGATAAAGCTT</u> GACAACAGACATGACTTCTT	
<i>dsTPS2-F</i>	<u>GTGACGCGTGGATCCCCGGG</u> CGATTCTCCTCATTGTTAGAC	
<i>dsTPS2-R</i>	<u>GTCGACGGTATCGATAAAGCTT</u> AGTGCTGTGAATATGTGTTG	
<i>dsGFP-F</i>	<u>GTGACGCGTGGATCCCCGGG</u> CCAACACTTGTCACTACTTTC	
<i>dsGFP-R</i>	<u>GTCGACGGTATCGATAAAGCTT</u> ACAACTCAAGAAGGACCAT	
<i>qAb18S-F</i>	TGCGGTAATTCTGGAGCCAA	qPCR
<i>qAb18S-R</i>	CCCGTTAGAACCATGGCAGT	
<i>qTPS1-F</i>	GCATTCCAATCCGAGCACAC	
<i>qTPS1-R</i>	TTCTCCTGCATGTCCGTTCC	
<i>qTPS2-F</i>	TACAAGATGCAAGCCGTTCC	
<i>qTPS2-R</i>	TTGCTGTTGTCGCTGTTGAC	

序列下划线为载体同源序列,加粗斜体为限制性内切酶 *Hind* III 和 *Sma* I 的酶切位点。

### 1.4 重组表达菌株构建

根据 RNAi 载体 L4440 多克隆位点序列,设计

含载体接头序列的引物,以方法 1.3 测序正确的重组质粒为模板 PCR 扩增 TPS 序列,并以 pCam-

bia1304 载体 DNA 为模板 PCR 扩增绿色荧光蛋白 (GFP) 片段。PCR 反应体系 50  $\mu\text{L}$ : 2 $\times$ Phanta Master Mix (南京诺唯赞生物科技股份有限公司产品) 25  $\mu\text{L}$ 、上下游引物 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 各 2  $\mu\text{L}$ 、质粒模板 (10 ng) 2  $\mu\text{L}$ 、ddH<sub>2</sub>O 19  $\mu\text{L}$ 。反应程序如下: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 15 s, 58  $^{\circ}\text{C}$  退火 15 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 45 s, 32 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  补充延伸 5 min。采用 ClonExpress II one step cloning kit (南京诺唯赞生物科技股份有限公司产品) 将靶标片段连接至 *Hind* III 和 *Sma* I 双酶切的 L4440 载体, 并转化至 RNase III 缺陷型大肠杆菌 (*Escherichia coli*) HT115 (DE3) 菌株, 测序验证正确的转化子菌液保存备用。

### 1.5 靶标 dsRNA 细菌表达的诱导及诱导条件优化

将含有 *AbTPS1*-L4440 重组质粒的 *E. coli* HT115 (DE3) 转化子菌液按体积比 1 : 1 000 添加至含氨苄青霉素 100.0  $\mu\text{g/mL}$ 、四环素 12.5  $\mu\text{g/mL}$  的 LB 液体培养基, 180 r/min 37  $^{\circ}\text{C}$  振荡培养 16 h。吸取 0.2 mL 培养菌液加到 20 mL 含上述抗生素的 LB 培养基继续培养, 至对数生长期 ( $OD_{600} = 0.4$ ), 加入 IPTG (异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷, 上海 Sigma-Aldrich 公司产品) 进行诱导。为明确靶标 dsRNA 细菌表达的适宜诱导条件, 本研究设置 0  $\mu\text{mol/mL}$ 、0.1  $\mu\text{mol/mL}$ 、0.5  $\mu\text{mol/mL}$  和 1.0  $\mu\text{mol/mL}$  4 个 IPTG 浓度, 分别振荡诱导 4 h, 测定不同 IPTG 浓度下的 dsRNA 产量, 以明确适宜的 IPTG 诱导浓度。并在 0.5  $\mu\text{mol/mL}$  的 IPTG 浓度下, 分别振荡诱导 2 h、4 h、6 h、8 h 和 10 h, 测定不同诱导时间下的 dsRNA 产量以确定最佳诱导时间。每处理设 3 个重复。

### 1.6 细菌表达 dsRNA 提取

取 IPTG 诱导的新鲜菌液 10 mL, 4  $^{\circ}\text{C}$  离心收集菌体沉淀, 加入 1 mL Trizol 试剂裂解细胞, 提取细菌 RNA, 提取方法同方法 1.2。为大量制备 dsRNA、降低生产成本, 进一步分别采用甲酰胺法和乙醇-氯化钠 (EtOH-NaCl) 法提取 RNA。甲酰胺法提取 RNA 的方法如下: 在 10.0 mL 菌液沉淀中加入 1.0 mL 含 98.0% 甲酰胺、0.2% 巯基乙醇、0.1% 十二烷基硫酸钠、0.5 mol/L 乙二胺四乙酸的提取缓冲液, 涡旋后置于 60.0  $^{\circ}\text{C}$  水浴 20 min 使菌体充分裂解, 离心收集上清液, 并通过异丙醇-乙醇法纯化 RNA<sup>[17-18]</sup>。乙醇-氯化钠 (EtOH-NaCl) 法提取 RNA 的方法如下: 10 mL 菌液 80  $^{\circ}\text{C}$  孵育 20 min, 离心收集菌体沉淀,

依次用 75% 乙醇 (1 $\times$  PBS 缓冲液配制) 和 150  $\mu\text{mol/mL}$  NaCl 重悬菌体沉淀, 离心收集上清液, 得到 RNA 粗提液<sup>[19]</sup>。使用 T7 RNAi transcription kit (南京诺唯赞生物科技股份有限公司产品) 处理 RNA, 每 20  $\mu\text{L}$  RNA 粗提液加入 1  $\mu\text{L}$  质量浓度为 2 ng/ $\mu\text{L}$  的 DNase I 和 1 个单位 RNase A, 于 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min 以消化残留单链 RNA 和 DNA。上述方法提取的 RNA 均通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop 2000 分光光度计测定 dsRNA 质量和产量。每处理设 3 个重复。

### 1.7 RNA 干扰

将 2 000 条线虫分别浸泡于 1 $\times$  M9 缓冲液、1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  的 *AbTPS1* 基因 dsRNA、1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  的 *AbTPS2* 基因 dsRNA 和 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  的 *GFP* 基因 dsRNA 中, 25  $^{\circ}\text{C}$  避光处理 24 h, 通过荧光定量 PCR (qPCR) 检测 *AbTPS1* 和 *AbTPS2* 基因沉默效率。采用 Evo M-MLV 反转录试剂盒 (湖南艾科瑞生物工程有限公司产品) 进行 cDNA 模板制备, 通过 SYBR Green Premix Pro Taq HS 试剂盒 (湖南艾科瑞生物工程有限公司产品) 在 LightCycler 96 PCR 平台 (德国 Roche 公司产品) 进行 qPCR 分析。以水稻干尖线虫 18S rDNA 为内参基因, 分别以特异性引物 *qAbTPS1*-F/*qAbTPS1*-R 和 *qAbTPS2*-F/*qAbTPS2*-R 检测 *AbTPS1* 和 *AbTPS2* 的相对表达水平。相对基因表达水平通过  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算<sup>[20]</sup>。为检测靶标基因沉默后水稻干尖线虫对逆境胁迫的适应能力, 按照文献 [21] 的方法, 对 RNA 干扰后的水稻干尖线虫分别进行 4  $^{\circ}\text{C}$  低温、40  $^{\circ}\text{C}$  高温和常温干燥脱水处理, 每处理 100 条线虫, 48 h 后将虫体转移至室温无菌水中, 在体视显微镜下观察线虫活性, 以线虫虫体僵直或呈“C”形弯曲、针触无反应为依据判定线虫是否死亡, 并统计存活率<sup>[22]</sup>。

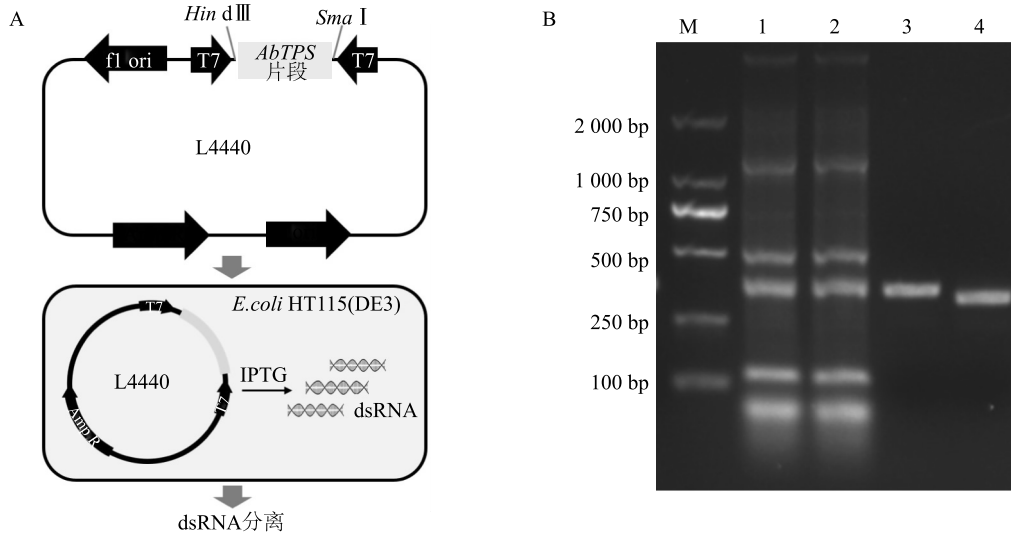
## 2 结果与分析

### 2.1 TPS 靶标序列的扩增和双链 RNA 制备

利用 L4440 载体在 *E. coli* HT115 中表达产生靶标 dsRNA 的流程见图 1A。基于 NCBI 数据库中 *AbTPS1* 和 *AbTPS2* cDNA 序列设计的特异引物, PCR 扩增分别获得 358 bp 和 329 bp 片段条带, 经测序验证其序列与预期一致。采用同源重组法分别将获得的 *AbTPS1* 和 *AbTPS2* 构建至 L4440 载体, 并转化至 HT115 菌株, 待细菌生长至指数期加 IPTG 诱导后

可见目标条带。当用 RNase A 和 DNase I 消化单链

RNA 和 DNA 后,dsRNA 条带清晰可见(图 1B)。



A:RNAi 载体构建及细菌表达 dsRNA 体系流程图;B:细菌表达靶标基因 dsRNA 电泳检测。M:DNA 分子标尺;1:细菌表达含 *dsAbTPS1* 的总产物;2:细菌表达含 *dsAbTPS2* 的总产物;3:经 RNase A 和 DNase I 消化后的 *dsAbTPS1*;4:经 RNase A 和 DNase I 消化后的 *dsAbTPS2*。

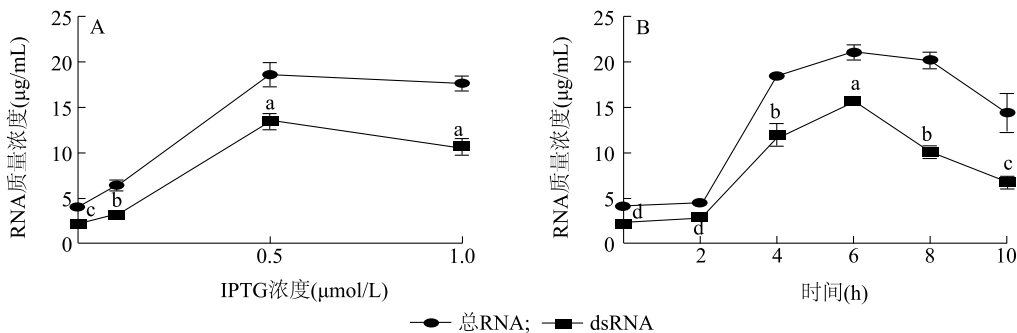
图 1 细菌表达靶标基因双链 RNA 的制备及电泳检测

Fig.1 Preparation and electrophoresis detection of bacterially expressed double-stranded RNA

### 2.2 dsRNA 诱导条件的优化

以 *AbTPS1* 为测试对象,不同 IPTG 诱导浓度和时间下,细菌表达载体产生 dsRNA 质量浓度的变化如图 2 所示。从图中可以看出,随着 IPTG 浓度的增加,dsRNA 质量浓度呈先增后减的趋势,0  $\mu\text{mol/mL}$ 、0.1  $\mu\text{mol/mL}$ 、0.5  $\mu\text{mol/mL}$  及 1.0  $\mu\text{mol/mL}$  IPTG 诱导浓度下,细菌表达载体产生的 dsRNA 质量浓度分别为 2.13  $\mu\text{g/mL}$ 、3.11  $\mu\text{g/mL}$ 、

13.45  $\mu\text{g/mL}$ 及 10.67  $\mu\text{g/mL}$ ,即细菌表达载体产生 dsRNA 的适宜 IPTG 浓度为 0.5  $\mu\text{mol/mL}$ (图 2A)。当 IPTG 浓度为 0.5  $\mu\text{mol/mL}$ 时,随着诱导时间的增加,细菌表达载体产生的 dsRNA 质量浓度亦呈先增加后减少趋势,当诱导时间 6 h 时,细菌表达载体产生的 dsRNA 质量浓度达到最高(图 2B)。因此细菌表达载体产生 dsRNA 的适宜 IPTG 浓度为 0.5  $\mu\text{mol/mL}$ ,诱导时间为 6 h。



A:不同 IPTG 浓度对 dsRNA 产量的影响;B:不同诱导时间对 dsRNA 产量的影响。同一图中不同小写字母表示不同诱导条件细菌表达载体产生的 dsRNA 质量浓度差异显著 ( $P < 0.05$ )。

图 2 不同诱导条件对细菌表达载体产生 dsRNA 质量浓度的影响

Fig.2 Effects of different induction conditions on the mass concentration of double-stranded RNA (dsRNA) produced by bacterial expression vectors

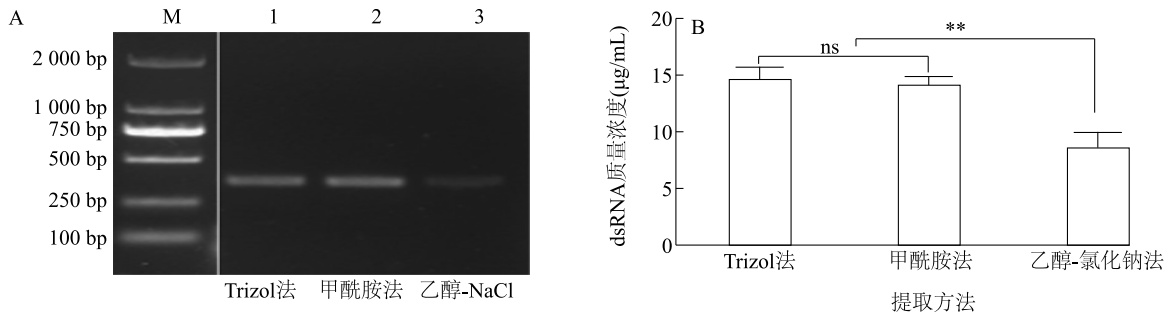
### 2.3 不同提取方法对 dsRNA 质量浓度的影响

基于上述最优 dsRNA 诱导条件,分别采用 Trizol

法、甲酰胺法及乙醇-NaCl 法提取细菌总 RNA,并经 DNase I 和 RNase A 对 DNA 和单链 RNA 消除后,不

同提取方法得到的电泳图和 dsRNA 质量浓度如图 3 所示。从图中可以看出,Trizol 法、甲酰胺法及乙醇-NaCl 法均可获得单一条带(图 3A);采用 Trizol 法或甲酰胺法提取获得的 dsRNA 质量浓度显著高于乙

醇-NaCl 法,而 Trizol 法和甲酰胺法得到的 dsRNA 质量浓度无显著差异(图 3B)。由于甲酰胺法提取 dsRNA 所需的成本更低,所以从大量生产 dsRNA 的角度,使用甲酰胺法提取 dsRNA 是合适的。



A: Trizol 法、甲酰胺法及乙醇-氯化钠法提取细菌总 RNA,并经 RNase A 和 DNase I 消化后的电泳图;M: DNA 分子标尺;1、2、3 分别表示 Trizol 法、甲酰胺法及乙醇-NaCl 法提取的细菌总 RNA 电泳图。B: Trizol 法、甲酰胺法及乙醇-NaCl 法提取得到的 dsRNA 质量浓度。ns、\*\* 分别表示处理间差异不显著和差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

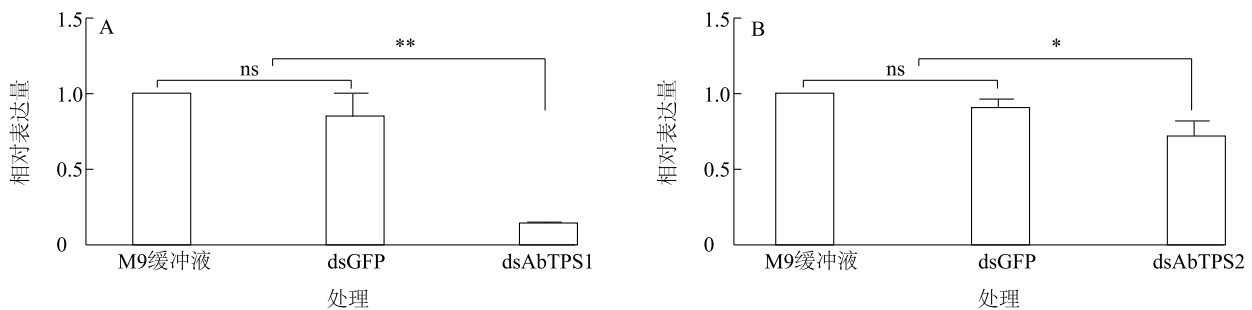
图 3 不同提取方法得到的 dsRNA 电泳图和质量浓度

Fig.3 Electrophoretogram and mass concentration of double-stranded RNA (dsRNA) obtained by different extraction methods

## 2.4 RNAi 效果评价

用细菌表达的 dsAbTPS1 和 dsAbTPS2 浸泡线虫 24 h,对应靶标记基因 *AbTPS1* 和 *AbTPS2* 的表达水均低于 M9 缓冲液处理和 dsGFP 处理(图 4A、图 4B)。在常温(25 °C)、低温(4 °C)、高温(40 °C)及脱水干燥逆境中,M9 缓冲液处理和 dsGFP 处理的线虫存活率均超过 94%,而经细菌表达的 dsAbTPS1 处理和 dsATPS2 处

理的线虫在常温(25 °C)下的存活率分别为 75.33%和 81.33%,均显著低于 M9 缓冲液处理和 dsGFP 处理。在低温(4 °C)、高温(40 °C)及脱水干燥逆境下,dsAbTPS1 处理和 dsAbTPS2 处理的线虫存活率为 39.67%~62.67%,显著低于 M9 缓冲液处理和 dsGFP 处理(表 2)。



A: *AbTPS1* 的相对表达水平;B: *AbTPS2* 的相对表达水平。M9 缓冲液、dsGFP、dsAbTPS1、dsAbTPS2 分别利用 1×M9 缓冲液、GFP 基因的 dsRNA、*AbTPS1* 基因的 dsRNA、*AbTPS2* 基因的 dsRNA 浸泡水稻干尖线虫 24 h 处理。\*\*、\* 分别表示处理间差异极显著 ( $P < 0.01$ ) 和差异显著 ( $P < 0.05$ );ns 表示处理间差异不显著。

图 4 dsRNA 处理对水稻干尖线虫 *AbTPS1* 和 *AbTPS2* 靶基因表达水平的影响

Fig.4 Effects of double-stranded RNA (dsRNA) treatment on the expression levels of *AbTPS1* and *AbTPS2* in *Aphelenchoides besseyi*

## 3 讨论与结论

目前,作物病虫害防治通常依赖化学药剂、品种抗性或其他农艺措施,但线虫病害防治缺乏有效技术手段或抗性资源<sup>[2]</sup>。基于 RNAi 技术,应用 dsR-

NA 干扰线虫重要靶标基因的表达水平,有效降低植物病原线虫环境适应性,可达到杀虫防病的目的<sup>[23]</sup>。一般而言,体外 dsRNA 合成需要分别转录合成正义 RNA 和反义 RNA 序列,然后退火形成 dsRNA 片段,但该方法大多依赖商业化的试剂盒,

表 2 dsRNA 处理后的线虫在不同温度和脱水干燥胁迫下的存活率  
Table 2 Survival rate of *Aphelenchoides besseyi* treated with double-stranded RNA (dsRNA) under temperature and dehydration stresses

处理	存活率(%)			
	25 °C	4 °C	40 °C	脱水干燥
M9 缓冲液	96.00±2.00a	99.33±0.58a	98.67±1.53a	94.67±1.53a
dsGFP	95.00±1.00a	95.00±2.00a	95.67±1.53a	93.67±1.53a
dsAbTPS1	75.33±1.15c	43.33±1.53c	51.33±1.53c	39.67±1.15c
dsAbTPS2	81.33±0.58b	55.00±3.00b	62.67±2.08b	53.00±1.00b

M9 缓冲液、dsGFP、dsAbTPS1、dsAbTPS2 见图 4 注。同一列数据后不同小写字母表示处理间差异显著 ( $P < 0.05$ )。

成本高昂且流程复杂,不适用病虫害防治规模化应用<sup>[24]</sup>。原核表达系统生产 dsRNA,因具备低成本、效率高等优点,适合批量制备 dsRNA<sup>[25]</sup>。

转化 L4440 RNAi 载体的 *E. coli* HT115 诱导生产 dsRNA 的产量,取决于 dsRNA 序列及培养方法<sup>[3]</sup>。计慧君等<sup>[26]</sup>构建了褐飞虱蛋白激酶 B 双链 RNA(dsNIAKT)的原核表达体系,发现当 IPTG 工作浓度为 0.1  $\mu\text{mol/mL}$  和 0.5  $\mu\text{mol/mL}$ ,细菌表达 dsNIAKT 水平显著高于 1.0  $\mu\text{mol/mL}$ ,说明低浓度 IPTG 有助于提高 dsRNA 产生。本研究结果表明 0.5  $\mu\text{mol/mL}$  IPTG 浓度能诱导 dsRNA 的高表达,而 0.1  $\mu\text{mol/mL}$  的 IPTG 不利于 dsRNA 的制备。同时,随着诱导时间延长,细菌表达载体表达的 dsRNA 质量浓度呈先增加后减少的趋势,在诱导 6 h 时,dsRNA 质量浓度达到最高,说明 6 h 是本细菌表达体系下的最优诱导表达时间,这一结果与前人的研究结果基本一致<sup>[26]</sup>。Papic 等<sup>[27]</sup>发现 dsRNA 的产生与表达细菌生物量密切相关,通过分批进料增加菌体生物量的方式最高可产生 182 mg/L dsRNA,这使得细菌表达 dsRNA 大规模制备成为可能,其制备成本也远低于体外试剂盒的制备方法。本研究以 dsAbTPS1 为对象进行测试,优化后的细菌表达体系最高可产生超过 15  $\mu\text{g/mL}$  质量浓度的 dsRNA。本研究还比较了 3 种常用提取细菌 RNA 方法的效率,其中 Trizol 法和甲酰胺法提取 RNA 的质量和效率优于乙醇-氯化钠法。Trizol 试剂是 RNA 提取最常用试剂,但价格比较昂贵,且萃取过程常需要使用氯仿等有毒试剂。甲酰胺试剂成本低廉,提取操作简便,适合于细菌表达的 dsRNA 批量制备。

Chen 等<sup>[11]</sup> 研究结果表明,海藻糖合成酶基因

*AbTPS1* 和 *AbTPS2* 参与水稻干尖线虫对逆境的适应过程,采用体外合成的 dsRNA 浸泡虫体能显著降低 *AbTPS1* 和 *AbTPS2* 的转录丰度,并导致低氧胁迫下线虫死亡率增加。本研究利用细菌表达的 dsAbTPS1 和 dsAbTPS2 浸泡线虫 24 h,靶标基因 *AbTPS1* 和 *AbTPS2* 的表达水平均显著下降,线虫在低温、高温和干燥脱水逆境下的存活率均低于 M9 缓冲液处理和 dsGFP 处理。说明 *AbTPS1* 和 *AbTPS2* 基因表达水平对水稻干尖线虫逆境生存能力有重要影响,通过细菌表达的 dsRNA 可有效降低 *AbTPS1* 和 *AbTPS2* 基因的表达水平,导致线虫在环境压力下的死亡率提高。

综上所述,本研究建立了水稻干尖线虫 *AbTPS* 基因的 dsRNA 细菌表达体系,通过优化诱导条件和提取方法,可实现 dsRNA 的批量生产,为利用 RNA 农药防治水稻干尖线虫提供了技术支持。

#### 参考文献:

- [1] PALLI S R. RNAi turns 25: contributions and challenges in insect science[J]. *Frontiers in Insect Science*, 2023, 3: 1209478.
- [2] ZHAO J H, LIU Q Y, XIE Z M, et al. Exploring the challenges of RNAi-based strategies for crop protection[J]. *Advanced Biotechnology*, 2024, 2(3): 23.
- [3] HOUGH J, HOWARD J D, BROWN S, et al. Strategies for the production of dsRNA biocontrols as alternatives to chemical pesticides[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022, 10: 980592.
- [4] TIMMONS L, COURT D L, FIRE A. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Gene*, 2001, 263(1/2): 103-112.
- [5] AHN S J, DONAHUE K, KOH Y, et al. Microbial-based double-stranded RNA production to develop cost-effective RNA interference application for insect pest management[J]. *International Journal of Insect Science*, 2019, 11: 1179543319840323.
- [6] LONG G J, LIU X Z, GUO H, et al. Oral-based nanoparticle-wrapped dsRNA delivery system: a promising approach for controlling an urban pest, *Blattella germanica*[J]. *Journal of Pest Science*, 2024, 97(2): 739-755.
- [7] 马中正, 闫 硕, 沈 杰. 基于工程菌高效合成靶向昆虫基因的 dsRNA 的方法[J]. *应用昆虫学报*, 2019, 56(2): 342-347.
- [8] JONES J T, HAEGEMAN A, DANCHIN E G J, et al. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2013, 14(9): 946-961.
- [9] LIN M S, DING X F, WANG Z M, et al. Description of *Aphelenchoides besseyi* from abnormal rice with 'small grains and erect

- panicles' symptom in China[J]. Rice Science, 2005, 12(4): 289-294.
- [10] 谢家廉, 杨芳, 黄文坤, 等. 近年水稻主要线虫病害的研究进展[J]. 植物保护学报, 2017, 44(6): 940-949.
- [11] CHEN Q L, WANG F, LI D L, et al. Trehalose metabolism genes render rice white tip nematode *Aphelenchoides besseyi* (Nematoda: Aphelenchoididae) resistant to an anaerobic environment [J]. Journal of Experimental Biology, 2018, 221(4): jeb171413.
- [12] YANG H J, CUI M Y, ZHAO X H, et al. Trehalose-6-phosphate synthase regulates chitin synthesis in *Mythimna separata* [J]. Frontiers in Physiology, 2023, 14: 1109661.
- [13] XUE D R, YANG Y, FANG L W, et al. Trehalose 6-phosphate synthase gene rdtps1 contributes to thermal acclimation in *Rhizopertha Dominica* [J]. BMC Genomics, 2024, 25(1): 172.
- [14] 唐斌, 沈祺达, 曾伯平, 等. 褐飞虱一个新的海藻糖合成酶基因的特性、发育表达及 RNAi 效果分析[J]. 中国农业科学, 2019, 52(3): 466-477.
- [15] 蒋志洋, 师东梅, 陈怡彤, 等. 靶向稻瘟菌海藻糖-6-磷酸合成酶——具有新颖杀菌机制的含异丙醇胺片段化合物的筛选与发现 [C]//中国植物病理学会. 中国植物病理学会 2023 年学术年会论文集. 北京: 中国植物病理学会, 2023: 617.
- [16] FENG H, ZHOU D M, DALY P, et al. Characterization and functional importance of two glycoside hydrolase family 16 genes from the rice white tip nematode *Aphelenchoides besseyi* [J]. Animals, 2021, 11(2): 374.
- [17] ZHAO X L, LI Y, DUAN Y K, et al. A simple methodology for RNA isolation from bacteria by integration of formamide extraction and chitosan-modified silica purification [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2021, 413(26): 6469-6477.
- [18] 常瑞, 王俊, 付开赞, 等. 4 种原核表达双链 RNA 的 dsRNA 提取方法效果评价[J]. 新疆农业科学, 2021, 58(4): 700-711.
- [19] MA Z Z, ZHOU H, WEI Y L, et al. A novel plasmid-*Escherichia coli* system produces large batch dsRNAs for insect gene silencing [J]. Pest Management Science, 2020, 76(7): 2505-2512.
- [20] SCHMITTGEN T D, LIVAK K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method [J]. Nature Protocols, 2008, 3: 1101-1108.
- [21] FENG H, WEI L H, CHEN H G, et al. Calreticulin is required for responding to stress, foraging, and fertility in the white-tip nematode, *Aphelenchoides besseyi* [J]. Experimental Parasitology, 2015, 155: 58-67.
- [22] 赵一桐, 杨行州, 周冬梅, 等. 噻唑膦和吡虫啉二元复配剂防治水稻干尖线虫效果评价[J]. 江苏农业科学, 2024, 52(6): 131-136.
- [23] DING S W, WANG D W, XU C L, et al. A new fungus-mediated RNAi method established and used to study the fatty acid and retinol binding protein function of the plant-parasitic nematode *Aphelenchoides besseyi* [J]. RNA Biology, 2021, 18(10): 1424-1433.
- [24] 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.
- [25] NWOKEOJI A O, NWOKEOJI E A, CHOU T, et al. A novel sustainable platform for scaled manufacturing of double-stranded RNA biopesticides [J]. Bioresources and Bioprocessing, 2022, 9(1): 107.
- [26] 计慧君, 林羿光, 付彤煜, 等. 基于细菌体系生产双链 RNA 的条件优化[J]. 环境昆虫学报, 2023, 45(3): 703-710.
- [27] PAPIC L, RIVAS J, TOLEDO S, et al. Double-stranded RNA production and the kinetics of recombinant *Escherichia coli* HT115 in fed-batch culture [J]. Biotechnology Reports, 2018, 20: e00292.

(责任编辑: 石春林)