技术与方法

基于工程菌高效合成靶向昆虫基因的 dsRNA 的方法*

马中正** 闫 硕*** 沈 杰

（中国农业大学昆虫学系和农业部有害生物监测与绿色防控重点实验室，北京 100193）

摘 要 外源或内源双链 RNA(dsRNA)可以干扰昆虫基因的表达。目前，利用 RNA 干扰(RNAi)技术防治农业害虫已经取得了一定进展，但高昂的 dsRNA 合成成本是 RNAi 技术在田间应用的主要限制因素。本方法利用 L4440 质粒和大肠杆菌 HT115(DE3)菌株，建立了一种经济、高效的昆虫靶标基因 dsRNA 合成方法。与商业化的 dsRNA 合成试剂盒相比，工程菌合成 dsRNA 的方法大幅降低了 dsRNA 的合成成本。本方法将为大规模昆虫基因功能解析和 RNAi 制剂的田间应用提供可能，有望促进以 RNAi 为核心的害虫防治技术的实践和发展。

关键词 RNA 干扰；dsRNA 合成；L4440；HT115(DE3)

An efficient dsRNA production method based on engineering bacteria for targeted insect genes

MA Zhong-Zheng** YAN Shuo*** SHEN Jie

(Department of Entomology and MOA Key Laboratory for Monitory and Green Control of Crop Pest, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract Exogenous or endogenous double-stranded RNA (dsRNA) can be used to apply RNA interference (RNAi) to targeted insect genes. There has recently been progress in the utilization of RNAi technology to control agricultural pests. The high cost of dsRNA synthesis is the main obstacle to the application of RNAi in the field. We constructed a cheap and efficient dsRNA production method using the L4440 and HT115 (DE3) bacterial strains that can significantly reduce the cost of dsRNA production compared to commercial kits. Our method has the potential for large scale assays of insect gene function and for the field application of RNAi reagents, which may promote the practice and development of RNAi-based pest control.

Key words RNA interference; dsRNA production; L4440; HT115 (DE3)

RNA 干扰（RNAi）技术是一项重要的基因功能研究工具，自问世以来就在生命科学领域受到了广泛关注。它是生物体内的一种抵御外来遗传元件入侵的保护性机制。RNAi 具有高效特异性、可遗传性、远距离效应，以及 ATP 依赖性这四个重要特征（崔照琼等，2012）。利用 RNAi 技术，研究者可以根据研究目的，针对某个特定基因设计干扰引物，合成双链 RNA（dsRNA），再通过合理有效的手段将 dsRNA 导入生物体内，干扰目的基因表达，探究该基因的功能（朱睿等，2003）。

在对昆虫基因功能进行解析时，我们通常借助商业化的试剂盒来完成 dsRNA 的合成，高纯度的 dsRNA 有利于对昆虫功能基因进行较为精

*资助项目 Supported projects：北京市自然基金（6182020）；国家重点研发计划（2017YFD0201200）

**第一作者 First author，E-mail：m1394829269@163.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：yanshuo@cau.edu.cn

收稿日期 Received：2018-09-21；接受日期 Accepted：2018-12-12

确的调控，但其缺点也是显而易见的，高额的合成成本限制了 dsRNA 的大批量生产，制约了 RNAi 技术在防控田间害虫上的应用。而利用大肠杆菌 HT115(DE3)可以在低成本的基础上实现 dsRNA 的量产。HT115(DE3)是一个 Rnase III 缺陷型的菌株，通过在 *rnc* 基因内部插入 Tn10 转座子使其无法表达产生 Rnase III，从而避免了 dsRNA 的降解（Timmons *et al*., 2001）。此外，大肠杆菌 HT115(DE3)在 IPTG 的诱导下可以产生 T7 聚合酶，这使得我们可以通过构建带有 T7 启动子的 RNAi 干扰载体来实现 dsRNA 的大量合成。

本文以异色瓢虫 *Harmonia axyridis* (Pallas) *vestigial* 基因为例，通过构建带有目的基因片段的 RNAi 干扰载体，利用 IPTG 诱导大肠杆菌 HT115(DE3)表达合成 *vg*-dsRNA，为进一步大规模研究基因功能提供了技术基础。利用大肠杆菌诱导合成 dsRNA，代替化学农药对农业害虫进行防治，使得 RNA 制剂的田间应用成为了可能，有望促进以 RNAi 为核心的害虫防治技术的实践和发展。

1　材料与方法

1.1　实验材料

1.1.1　供试昆虫　异色瓢虫由中国农业大学昆虫发育学与植保新技术实验室继代饲养，饲养温度为 25-27 ℃，相对湿度为 50%-70%，光周期为 16 L∶8 D。

1.1.2　载体　L4440 质粒，购自北京华越洋生物科技有限公司。

1.1.3　菌株　大肠杆菌 HT115(DE3)型菌株由本实验室保存。

1.1.4　主要试剂　大肠杆菌感受态 DH5α，L4440 质粒；琼脂、氨蛋白胨、NaCl、琼脂粉、氨苄青霉素、甘油，四环素（Tet）等；全式金质粒小提试剂盒，琼脂糖凝胶回收试剂盒等；天根 2×Taq PCR MasterMix，擎科 pclone simple vector，限制性内切酶（*Sac* I，*Xho* I）等（NOVA）。

1.2　RNA 的提取及 dsRNA 合成引物的设计

异色瓢虫总 RNA 的提取采用试剂盒 RNA simple Total RNA Kit。使用 Thermo Nandrop 分光光度计（2000/2000C，赛默飞世尔）对 RNA 浓度进行测定，并利用 takara 反转录试剂盒完成 cDNA 的合成，操作步骤参考试剂盒使用说明书。

用于合成 *vg*-dsRNA 的引物如表 1 所示，上游引物加上 *Sac* I 酶切位点序列，下游引物加上 *Xho* I 的酶切位点序列。

表 1　*vg*-dsRNA 合成引物和重组质粒鉴定引物
Table 1　Primers for vg-dsRNA and identification of recombinant plasmids

引物 Primer	序列（5′-3′） Sequence
Vestigial -S F	CGAGCTCGAGTTGGCCGATACATATTGCG
Vestigial-X R	CCTCGAGGGCTGCTCCACCTGTTTCAG
L4440test-F	ACTATAGGGAGACCGGCAGAT
L4440test-R	GGGAAGAAAGCGAAAGGAGC

下划线部分为酶切位点以及保护碱基序列。
The underlined parts are the restriction sites and the base sequence for protection.

1.3　重组表达载体的构建

Vg-L4440 重组表达载体的构建以及 *vg*-dsRNA 诱导过程如图 1 所示，具体操作步骤如下。

1.3.1　pclone simple vector 克隆载体的构建

1.3.1.1　HT115（DE3）感受态细胞的制备　挑取 HT115（DE3）单克隆接种到 5 mL 含有 12.5 μg/mL Tet^+的 LB 培养基中，37 ℃振荡培养过夜，接种 1 mL 菌液于 100 mL 含有 Tet^+的 LB 培养基中，37 ℃振荡培养 3-4 h 至细菌达到对数生长期，此时 OD600≈0.5，将菌液冰上静置 30 min，4 ℃ 3 000 r/min 离心 10 min 收集菌体，加入 20 mL 预冷的 0.1 mol/L $CaCl_2$ 溶液轻轻悬浮菌体，冰上静置 15 min，4 ℃ 3 000 r/min 离心 10 min，弃上清，加入 2 mL 预冷的含 15 %甘油的 0.1 mol/L $CaCl_2$ 溶液，重悬菌体并分装于 1.5 mL 的离心管中，每管 100 μL，于－80 ℃存放。

1.3.1.2　目的基因 PCR 扩增及回收　使用天根 2×Taq PCR MasterMix 试剂，以异色瓢虫 cDNA 为模板，使用 1.2.2 中的引物进行 PCR 反应。PCR 反应程序：预变性 94 ℃ 3 min、变性 94 ℃

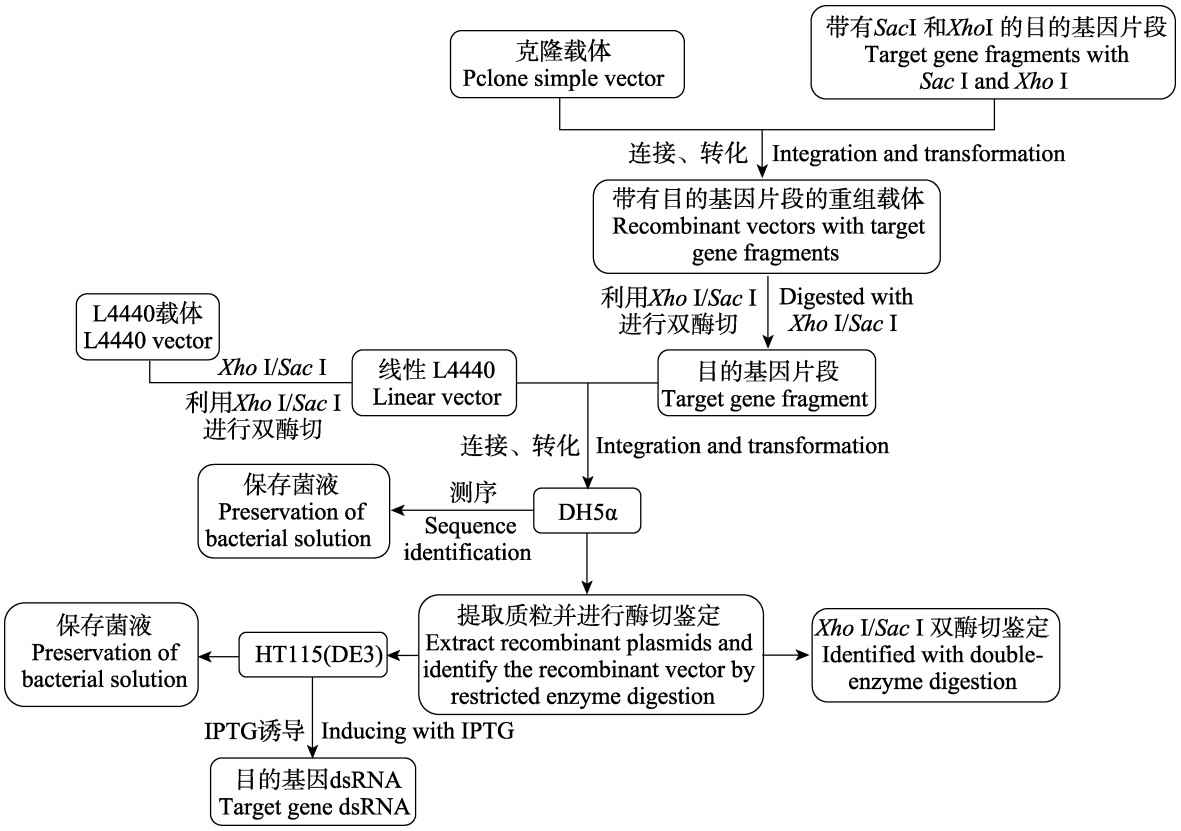

图 1 *Vg*-L4440 重组表达载体的构建以及 *vg*-dsRNA 诱导过程

Fig. 1 Construction of Vg-L4440 recombinant expression vector and *vg*-dsRNA induction process

30 s、退火 57 ℃ 30 s、延伸 72 ℃ 40 s，终延伸 72 ℃ 5 min，30 个循环，PCR 产物置于 4 ℃保存。

利用 Axygen DNA gel extraction kit 回收试剂盒回收 PCR 产物。

1.3.1.3 PCR 产物与克隆载体的连接与转化

利用擎科新业生物技术有限公司的 pclone007 Simple Vector Kit 试剂盒进行连接反应，取 100 μL HT115(DE3)感受态细胞冰浴融化 5 min，加入 10 μL 连接产物，轻轻吹打混匀，冰上静置 25 min；42 ℃热激 80 s 后迅速置于冰上冷却 3 min；加入 500 μL 不含抗生素的 LB 液体培养基，混匀后 37 ℃，200 r/min 复苏 1 h；吸取 200 μL 复苏后的菌液均匀涂布于含有 Amp 的 LB 平板上，并置于 37 ℃培养箱倒置培养过夜。

1.3.1.4 阳性克隆筛选 在平板上挑取 8 个单菌落，溶于 10 μL ddH_2O 中，并以此为模板，使用天根生化科技有限公司的 2×Taq PCR MasterMix 试剂进行 PCR 反应，用以鉴定目的片段是否接入克隆载体中。

在 L4440 质粒的 MCS 序列两端分别设计上游鉴定引物 L4440test-F 和下游鉴定引物 L4440test-R（表 1）。

将 PCR 产物进行跑胶鉴别，在紫外光下，条带长度为 885 bp 左右即为正确条带。将两个鉴定正确的阳性克隆菌分别混入 5 mL 含有氨苄青霉素的 LB 液体培养基中，37 ℃，210 r/min 震荡培养过夜。吸取 400 μL 菌液送公司测序，剩下的菌液保存于 4 ℃供提质粒使用。测序结果确认正确后使用全式金 Plasmid MiniPrep Kit 质粒小提试剂盒提取质粒。提取步骤参考试剂盒说明书进行。

1.4 L4440-*vg* 表达载体的构建

1.4.1 酶切片段的获得与 L4440 质粒的线性化

将上步所得的克隆载体进行双酶切。酶切体系为：8 μL DNA、2 μL 10×CutOne^{TM}Buffer、1 μL *Sac* I、1 μL *Xho* I，8 μL 去离子水，总体积为

20 μL，37 ℃温育 15 min。琼脂糖凝胶电泳跑胶，回收目的片段 DNA。同时将 L4440 质粒用 *Sac* I 和 *Xho* I 进行双酶切，琼脂糖凝胶电泳跑胶并回收目的片段 DNA。

1.4.2　L4440-*vg* 重组载体的构建与转化　使用 T4 DNA 连接酶将线性化 L4440 质粒与酶切所得的目的基因片段进行连接反应。将 10 μL DNA 连接产物转入 100 μL HT115（DE3）感受态中，最后吸取 300 μL 涂布于含有 100 mg/mL 的 Amp^+ 的固体培养基上，37 ℃过夜倒置培养。

次日随机挑取 6 个平板上的单菌落，溶于 10 μL ddH_2O 中，并以此为模板利用上文设计的 L4440 鉴定引物进行 PCR 反应。将鉴定正确的菌接种于 15 mL 的 LB 培养基中（Amp^+），37 ℃，240 r/min 振荡过夜培养，第 2 天早上吸取 5 mL 提质粒并进行双酶切鉴定，剩余菌液供 dsRNA 诱导表达使用。

1.5　*Vestigial* dsRNA 的诱导表达

取之前过夜培养的菌液，以 1∶100 的体积比接种于 100 mL 的 LB 液体培养基（Amp^+）中，37 ℃ 240 r/min 振荡培养 3 h 左右至菌液 OD595≈0.4；加入经过滤菌处理的 IPTG 使其终浓度为 0.4 mmol/L，继续振荡培养 4 h；收集菌液用于提取 HT115（DE3）总 RNA。

1.5.1　Trizol 法提取大肠杆菌 HT115（DE3）总 RNA　取 50 mL 诱导后的菌液，12 000 r/min 离心 2 min，弃上清；加入 1 mL Trizol 充分裂解细菌，注意不要有小的菌块残留，混匀后室温静置 5 min；加入 200 μL 氯仿，剧烈震荡 15 s 至溶液成乳白色，静置 2 min；4 ℃ 12 000 r/min 离心 15 min，小心吸取上清至无酶处理的离心管中；加入 500 μL 异丙醇，将管中液体轻轻颠倒混匀 10 次，室温静置 10 min；4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min，弃上清；加入 1 mL 75 %乙醇，轻轻洗涤沉淀，然后 4 ℃ 7 500 r/min 5 min，彻底去除上清；室温静置晾干 10 min，加入 30 μL 的 Nμclease Free Water 溶解沉淀，进行电泳检测，－80 ℃保存。

1.5.2　75%乙醇固定法抽提大肠杆菌 HT115（DE3）总 RNA　用 75%乙醇固定法（Sohai, *et al.*，2003；Posiri *et al.*，2013）提取 HT115（DE3）总 RNA 操作如下：

取 50 mL 诱导后的菌液，4 ℃ 12 000 r/min 离心 2 min，弃上清；加入 2 mL 75%乙醇（PBS 配制），吹打混匀后室温静置 5 min，然后 4 ℃ 8 000 r/min 离心 5 min，弃上清；用 500 μL 150 mmol/L 的 Nacl 溶液悬浮沉淀物，接着室温静置 1 h 左右；4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min，获取上清液；进行电泳检测，－80 ℃保存。

2　结果与分析

2.1　目的基因的克隆

以异色瓢虫 cDNA 为模板，进行目的基因的克隆，得到 400 bp 的片段，如图 2 所示。

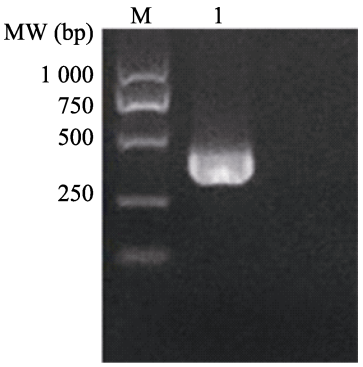

图 2　目的基因克隆

Fig. 2　Cloning of the target gene

M：Marker；1：带有酶切位点的 *vg* 克隆片段。

M: Marker；1: *vg* clone fragments with restriction sites.

2.2　重组载体的鉴定

随机挑取白色单菌落进行 PCR 鉴定（图 3：A），对照应为 485 bp，阳性克隆产物应为 885 bp。对重组质粒进行双酶切鉴定，此时重组质粒被切割为 2 667 bp 和 400 bp 两部分（图 3：B）。

2.3　IPTG 诱导 HT115（DE3）合成 *vg*-dsRNA

将加入 IPTG 诱导后的菌液收集并提取总 RNA，已知目的基因的长度约为 400 bp，将提取的 HT115（DE3）进行电泳检测，发现 400 bp

左右的位置出现很亮的目的条带，说明 *vg* dsRNA 诱导成功（图 4）。

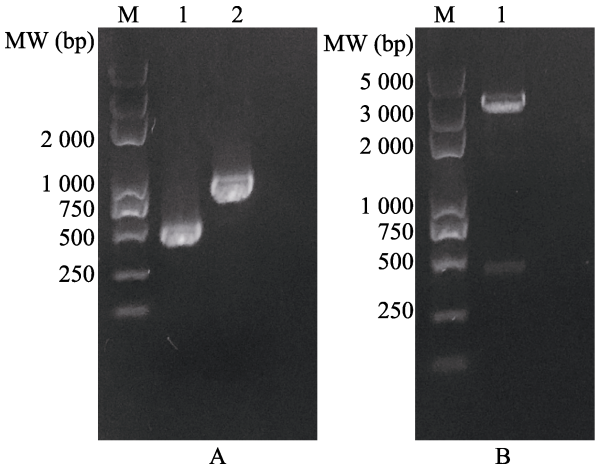

图 3 重组载体的鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant vector

A. 克隆载体的 PCR 鉴定；B. 克隆载体双酶切鉴定。M：Marker；A-1：空载 L4440 PCR 鉴定；A-2：L4440-*vg* PCR 鉴定；B-1：双酶切鉴定。

A. PCR identification of RNAi vector; B. Restriction enzyme identification of RNAi vector. M: Marker；A-1: PCR identification of L4440；A-2: PCR identification L4440-*vg*；B-1: Restriction enzyme identification.

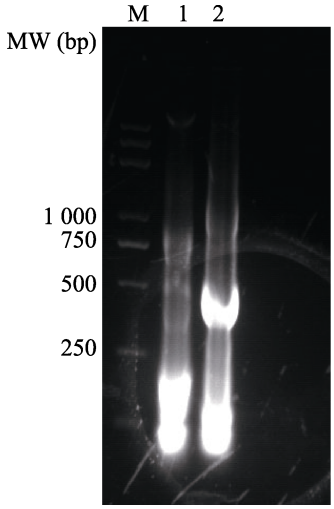

图 4 *vg*-dsRNA 的诱导表达

Fig. 4 Induced expression of vg-dsRNA

M：Marker；1：含 L4440 的 HT115（DE3）诱导表达结果；2：含 L4440-*vg* 的 HT115（DE3）诱导表达结果。

M: Marker; 1: Induced expression of HT115 (DE3) containing L4440; 2: Induced expression of HT115 (DE3) containing L4440-*vg*.

3 讨论

本文通过构建带有异色瓢虫 *vg* 基因的 RNAi 载体，将其转入大肠杆菌 HT115（DE3）中，实现了 *vg* 基因 dsRNA 的量产。目前在昆虫基因功能的研究中常用的 RNAi 导入方法有注射，饲喂以及浸泡法。在 RNAi 介导的田间害虫防治的应用中，注射法显然不适宜用于田间的害虫防治。少数昆虫可以利用饲喂法，通过将害虫致死基因的 dsRNA 混入人工饲料中，使昆虫连续摄入 dsRNA，从而抑制靶标基因的表达，达到杀死害虫的目的（Zhu *et al.*, 2011）。除此之外，我们还可以将 dsRNA 与纳米载体结合，通过纳米载体携带双链 RNA 进入昆虫体内，以达到 RNAi 的增效减量效果（He *et al.*, 2013）。两种防治策略对 dsRNA 需求量极大，使用商业化试剂盒合成 dsRNA 的成本太高，且操作复杂，无法满足田间应用的需求。

本实验利用大肠杆菌 HT115(DE3)合成目的基因的 dsRNA，可以极大降低合成成本，简化合成步骤。在确定害虫致死基因后，我们只需设计带有害虫靶标基因序列的 RNAi 载体，再将载体转入 HT115(DE3)中，就可以不断的得到大量目的基因的 dsRNA。需要注意的是，在提取的大肠杆菌总 RNA 中不光含有 dsRNA，还伴随着一些核糖体 RNA，在加入 RNase A 酶进行消化后也无法得到纯净的双链 RNA。由于无法对大肠杆菌合成的 dsRNA 进行定量分析，使得这一方法在昆虫基因功能的相关研究中存在一定的局限性，但较低的生产成本使得田间大量使用 dsRNA 进行害虫防治成为了可能。目前，我实验室已经成功在大豆蚜上建立了一种纳米材料介导的 dsRNA 体壁渗透系统，通关干扰关键基因表达，起到了很好的种群控制效果，工程菌合成 dsRNA 技术有望进一步应用于 dsRNA 的合成以降低 RNA 农药的应用成本（Zheng *et al.*, 2019）。

利用工程菌合成昆虫靶标基因 dsRNA 这一技术的实现，为 RNAi 制剂的研发建立了低成本的物质基础，将推动以 RNAi 核心技术的害虫防治新技术的发展。

参考文献 (References)

Cui ZQ, Zhang Y, Li YQ, 2012. New development of RNAi technology. *Anhui Medical and Pharmaceutical Journal*, 16(3): 283–285. [崔照琼, 张彦, 李艳琼, 2012. RNA 干扰技术应用新进展. 安徽医药, 16(3): 283–285.]

He BC, Chu Y, Yin MZ, An CJ, Shen J, 2013. Fluorescent nanoparticle delivered dsRNA toward genetic control of insect pests. *Advanced Materials*, 25(33): 4580–4584.

Posiri P, Ongvarrasopone C, Panyim S, 2013. A simple one-step method for producing dsRNA from *E. coli* to inhibit shrimp virus replication. *Journal of Virological Methods*, 188(1/2): 64–69.

Sohail M, Doran G, Riedemann J, Macaμlay V, Soμthern EM, 2003. A simple and cost-effective method for producing small interfering RNAs with high efficacy. *Nucleic Acids Research*, 31(7): e38.

Timmons L, Court DL, Fire A, 2001. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene*, 263(1): 103–112.

Zheng Y, Hu R, Yan S, Zhou H, Song D, Yin M, Shen J, 2019. A polymer/detergent formulation improves dsRNA penetration through the body wall and RNAi-induced mortality in the soybean aphid *Aphis glycines*. *Pest Management Science*, Doi: 10. 1002/ps. 5313.

Zhu F, Xu J, Palli R, Ferguson J, Palli SR, 2011. Ingested RNA interference for managing the populations of the colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Pest Management Science*, 67(2): 175–182.

Zhu R, Zhang KL, Zou XY, 2003. RNA interference technique and using in study of functional genomics. *Journal of Dalian Medical University*, 25(2): 105–107. [朱睿, 张开立, 邹向阳, 2003. RNA 干扰(RNAi)技术及其在功能基因组学研究中的应用. 大连医科大学学报, 25(2): 105–107.]