

基于滚环转录技术的 siRNA 递送策略 对粘虫的干扰效果*

朱语彤** 孔令浩 徐嘉政 郑旭霞 万年峰 须志平***

(华东理工大学药学院, 上海市化学生物学(芳香杂环)重点实验室, 上海 200237)

摘要 【目的】评估基于滚环转录技术的 siRNA 递送策略对粘虫 *Mythimna separata* 的 RNA 干扰效果。

【方法】采用荧光定量 PCR, 测定靶标基因 *Msa-tubulin* 和 *Msb-tubulin* 的沉默效率; 通过饲喂方法进行生物测定, 观察经滚环转制备的 RNA 微球处理粘虫 3 龄幼虫后其体重、体长和致死表型特征的变化。

【结果】靶标基因沉默效率测定结果表明, RNA 微球处理 24 h 后, *Msa-tubulin* 和 *Msb-tubulin* 的基因表达量分别下降 51.6% 和 44.3%; *Msa-tubulin* 在 48 h 的表达量下降 32.0%, 在 72 h 的表达量上调 134.4%; 处理 48 和 72 h 后, *Msb-tubulin* 的表达量分别上调 120.5% 和 129.0%。生物学干扰效应结果表明, 与对照组相比, 处理 7 d 后, *Msa-tubulin* 处理组幼虫体重、体长分别下降 51.1% 和 34.9%, 而 *Msb-tubulin* 处理组的幼虫分别下降 49.0% 和 32.4%; 处理 14 d 后, 这两种靶标基因处理组的幼虫死亡率均为 42.2%。【结论】滚环转制备的 RNA 微球能够触发粘虫的 RNAi 响应, 干扰靶标基因的表达, 抑制幼虫体重、体长并引起粘虫明显的死亡。

关键词 粘虫; 滚环转录; RNA 微球; siRNA 疗法; RNA 干扰; 微管蛋白; 害虫防控

Assessing the interference effect of the siRNA delivery strategy on *Mythimna separata* using rolling circle transcription

ZHU Yu-Tong** KONG Ling-Hao XU Jia-Zheng ZHENG Xu-Xia
WAN Nian-Feng XU Zhi-Ping***

(Shanghai Key Laboratory of Chemical Biology, School of Pharmacy, East China University of
Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract 【Aim】To assess the effect of RNA interference of the siRNA delivery strategy on *Mythimna separata* using rolling circle transcription. 【Methods】We used qPCR to determine the silencing efficiency of the two target genes, *Msa-tubulin*, and *Msb-tubulin*. The RNAi Feeding Bioassay was used to observe changes in *M. separata* body weight, body length, and lethal phenotypes. Additionally, the 3rd instar larvae were treated with RNA microspheres, which were synthesized using the rolling circle transcription method. 【Results】After 24 h of RNA microsphere treatment, *Msa-tubulin* and *Msb-tubulin* expression decreased by 51.6% and 44.3%, respectively, demonstrating the effectiveness of the target gene silencing. After 48 h there was a further 32% decrease in the expression of *Msa-tubulin*, which then increased by 134.4% at 72 h. After 48 and 72 h of treatment, the expression level of *Msb-tubulin* was upregulated by 120.5% and 129.0%, respectively. The RNAi feeding bioassay results showed that after 7 days, larval body weight and body length decreased by 51.1% and 34.9%, respectively in the *Msa-tubulin* treatment group, and decreased by 49.0% and 32.4% in the *Msb-tubulin* treatment group, respectively, compared to the control. After 14 days, the mortality rate of larvae reached 42.2% for both the *Msa-tubulin* and *Msb-tubulin* treatment groups. 【Conclusion】RNA microspheres, created via the rolling circle transcription method, can trigger an RNAi response in *M. separata*, interfere with the expression of target genes, significantly increase *M. separata* mortality, and reduce larval weight and body length. The siRNA delivery strategy, utilizing rolling circle transcription, offers a

*资助项目 Supported project: 国家自然科学基金项目 (31501674)

**第一作者 First author, E-mail: 601769435@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: zhipingxu@ecust.edu.cn

收稿日期 Received: 2023-04-23; 接受日期 Accepted: 2023-07-07

novel approach to controlling *M. separata*.

Key words *Mythimna separata*; rolling circle transcription; RNA microsphere; siRNA therapy; RNA interference; tubulin; pest control

粘虫 *Mythimna separata* 属鳞翅目 Lepidoptera 夜蛾科 Noctuidae, 是一种主要以小麦、玉米、高粱、水稻等粮食作物和牧草为食源的广食性、迁飞性、间歇暴发性害虫 (江幸福等, 2014)。针对粘虫取食量大、繁殖速度快和短期内易暴发成灾等特性 (段云等, 2023), 目前生产上防控该虫主要依赖化学农药。然而, 化学防治诱发的“3R”问题广受诟病, 一定程度上阻碍了农业的可持续发展 (宋月芹等, 2017), 制定高效且生态安全的粘虫防控策略是当务之急。

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是指由小干扰 RNA (Small interfering RNA, siRNA) 引起的生物体内同源序列信使 RNA (mRNA) 特异性降解的现象 (Wittrup and Lieberman, 2015)。自 Fire 等 (1998) 发现以来, RNAi 已被广泛应用于昆虫基因功能的研究, 并在害虫防治领域展现出巨大潜力 (Nandety *et al.*, 2015; Kunte *et al.*, 2020)。RNA 干扰技术具有许多传统害虫防治方法无法比拟的特点和优势, 例如, 能够通过选择特定的序列区域, 针对性地降解靶标基因的 mRNA, 进而影响害虫的基因功能, 尤其是对非靶标生物无伤害、对生态环境友好 (Joga *et al.*, 2016)。近期有关粘虫 RNAi 的研究发现, 当粘虫的部分必需基因被沉默时, 其生长发育会受到限制, 继而诱发一系列的致死表型 (Liu *et al.*, 2020; Lu *et al.*, 2021)。前期研究证明了 RNAi 技术在防控粘虫中具有较强的应用潜力, 但粘虫体内非特异性核酸酶和肠道强碱性会导致 siRNA 在其肠道内过早降解, 从而降低 RNAi 效率 (Liu *et al.*, 2020; Lu *et al.*, 2021)。毫无疑问, 这限制了基于 RNAi 的粘虫防治策略的开发。

滚环转录是一种酶促 RNA 聚合方法, 能够在 T7RNA 聚合酶的作用下促使 DNA 环状模板转录生成具有多个重复 RNA 拷贝的聚合 RNA 链 (Wang *et al.*, 2019)。在 DNA 模板合理设

计的情况下, 大量的聚合 siRNA 转录本能够进一步浓缩并通过生物本身的自组装机制形成 RNA 微球。这种稳定的微球结构能够为 siRNA 提供稳定的递送环境并将其成功转运到细胞质, 避免 siRNA 过早降解 (Lee *et al.*, 2012)。在医药领域, 该方法为 siRNA 疗法提供了新路径, 目前已被广泛应用于靶向肿瘤细胞的 siRNA 递送和抗癌药物开发 (Jang *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2020), 但鲜少用于靶向昆虫细胞的递送, 其在害虫防治领域的应用潜力尚未得到充分认识。

微管蛋白 (Tubulin) 是细胞骨架微管的基本亚基, 能够帮助维持细胞形态, 并在细胞内运输, 在细胞分裂过程中发挥重要作用 (Hammond *et al.*, 2008)。昆虫中的微管蛋白分为 α -微管蛋白和 β -微管蛋白 2 个家族, 其在昆虫生长发育、蜕皮和繁殖过程中均起重要作用 (Smith *et al.*, 2007; Nielsen *et al.*, 2010)。科学家在粘虫中已鉴定出这两种微管蛋白基因, 并证实这两种微管蛋白基因是潜在的 RNAi 靶点 (樊东等, 2008; Wang *et al.*, 2018)。鉴于前人研究基础, 本研究以粘虫为研究对象, 以 *Msa-tubulin* 和 *Ms β -tubulin* 为靶标基因, 通过生物学和分子生物学方法, 研究滚环转录制备的 RNA 微球对粘虫的干扰效果, 旨在评估这种新型 siRNA 递送策略用于粘虫等鳞翅目害虫 RNAi 防控的可行性。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试植物品种为玉米杂交种大华 1146 (江苏省大华种业集团有限公司生产), 将其种植于 40 cm × 30 cm 的浅口盆中, 每盆播种 30 粒。将玉米苗培养于实验室自建温室内, 温度保持在 (22±1) °C, 相对湿度 65%±5%, 光周期 14 L : 10 D。当玉米幼苗长至 30 cm 左右时剪取叶片饲喂粘虫幼虫。

自河南省济源白云实业有限公司购买粘虫卵作为初始虫源, 将虫卵放在玉米苗上饲养, 连续饲养多代后, 供本试验使用。将取食玉米苗叶片的粘虫放置在 RXZ-280B 智能型人工气候培养箱(宁波江南仪器厂生产)内饲养, 饲养条件为: 温度(24±1)℃, 相对湿度 65%±5%, 光周期 14 L : 10 D。

1.2 试验设计与方法

1.2.1 滚环转录 DNA 模板的设计 从 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)中获取粘虫

2 个基因——*Msa-tubulin* (登录号: EU100016) 和 *Msβ-tubulin* (登录号: EU234504) 的编码区序列, 通过 siRNA 在线设计网站 BLOCK-iT RNAi Designer, 筛选有效的 21 bp 长度的靶点; 将所设计的靶点进一步构建成滚环转录所需的 DNA 模板序列, 即在 21 bp 的靶点序列及其互补序列中间插入一段碱基完全错配序列, 以方便转录后形成发卡结构。此外, 为了将线性模板成环, 在靶点序列及其互补序列的两端加入 T7 启动子引物的互补序列。线性 DNA 模板由南京金斯瑞生物科技有限公司合成, 序列详见表 1。

表 1 用于滚环转录和 qPCR 的特异性引物
Table 1 Specific primers used in rolling circle transcription (RCT) and qPCR

基因名称 Gene name	引物用途 Primer usage	DNA 模板及引物序列 (5'-3') DNA template and primer sequences (5'-3')
<i>Msa-tubulin</i>	RCT	ATAGTGAGTCGTATTAGACAACGAGGCCATCTACGACACTTGGTCGTAGATGGCC <u>TCGTTGTCATCCCT</u>
	qPCR	F: GGCAAGGAAATCGTAGAT R: GAAGGAGTGGAAGATAAGG
<i>Msβ-tubulin</i>	RCT	ATAGTGAGTCGTATTAAGTCATGTGACTGCCTTCAAGACTTGCTTGAAGGCAGTC <u>ACATGACTATCCCT</u>
	qPCR	F: ACACAGTAGTAGAACCTTAC R: GAAGCAGATGTCGTATAAAG
<i>EGFP</i>	RCT	ATAGTGAGTCGTATTACCCACCCTCGTGACCACCCTGACTTGCAGGGTGGTCACG <u>AGGGTGGGATCCCT</u>
<i>β-actin</i>	qPCR	F: GTCCTACGAACTTCCCGACG R: CCATACCCAGGAATGAGGGC

首尾两端序列为 T7 启动子互补序列, 下划线序列为靶标序列及其互补序列, “ACTTG” 为碱基完全错配序列。
The sequence at both ends is the complementary sequence of the T7 promoter, the underlined sequence is the target sequence and its complementary sequence, and “ACTTG” is the completely mismatched base sequence.

1.2.2 RNA 微球的制备 制备 RNA 微球(RNA microsphere, RMS)的方法, 参照 Lee 等(2017)。将 10 μmol/L 的线性 DNA 模板和 T7 启动子引物按 1 : 1 的比例混合均匀。在 95 ℃下将混合物加热 2 min, 缓慢冷却至 24 ℃, 放置 3 h 后收获的杂交产物即为带有缺口的环状 DNA 模板。向上述的杂交产物中加入 T4 DNA 连接酶(1 000 U/μL, 上海碧云天生物技术有限公司)和连接缓冲液, 让其在室温条件下反应 3 h, 形成闭合的环状模板。在 rNTP 存在的情况下, 将环状模板用 T7 RNA 聚合酶(20 U/μL, 上海碧云天生物技术有限公司)37 ℃孵育过夜, 产物即为 RNA 微球溶

液。用 3.5%的琼脂糖凝胶电泳验证 RNA 微球的产生, 采用 Synergy NEO 多功能酶标仪测定 RNA 的浓度和纯度。为避免杂质连接, 将 RNA 微球溶液超声 3 min; 通过动态光散射法(Dynamic light scattering, DLS)测量 RNA 微球的粒径。将 RNA 微球放于 - 20 ℃冰箱保存备用。

1.2.3 RNA 微球的稳定性测试 为探究 RNA 微球对 siRNA 的保护能力, 参考 Cooper 等(2020)的报道设计体外降解试验: 将 RNA 微球与粘虫中肠粗提液分别孵育 1、2、3 和 4 h, 以化学合成的 *EGFP* siRNA 作为对照。通过分析琼脂糖凝胶电泳条带亮度, 比较 RNA 微球与

EGFP siRNA 在中肠液中的降解情况。随机挑选 15 头 5 龄幼虫进行中肠解剖, 将被提取的中肠置于预冷的 $1\times$ PBS 溶液, 在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 $12\,000\text{ r/min}$ 离心 2 次 (每次 10 min), 所得上清液即为粘虫中肠粗提液, 将粗提液样品放于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。在孵育实验开始前, 利用 BCA 蛋白试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司) 测定粗提液样品的蛋白浓度, 随后将 $5\text{ }\mu\text{L}$ (250 ng) 的 RNA 微球溶液和 *EGFP* siRNA 溶液分别与 $5\text{ }\mu\text{L}$ ($3.5\text{ }\mu\text{g}$ 总蛋白) 的中肠液混合均匀, 于上述不同时间点取样, 用 $2\text{ }\mu\text{L}$ 的 EDTA (终浓度为 20 mmol/L) 停止反应, 并立即用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳观察。

1.2.4 RNAi 实验 随机选取 3 龄第 1 天的粘虫幼虫通过饲喂法进行 RNA 微球的生物测定试验, 处理组 RMS- α -tubulin 和 RMS- β -tubulin, 喂食量为 600 ng RNA 微球/幼虫; 另设 RMS-*EGFP* 饲喂组为阴性对照, 清水为空白对照。在测定试验开始前, 先将粘虫幼虫饥饿 12 h , 随后将幼虫置于底部直径为 3.1 cm 的塑料餐盒中 (每盒 1 头)。每天取 $10\text{ }\mu\text{L}$ $10\text{ ng}/\mu\text{L}$ 的 RNA 微球溶液涂抹于 $1\text{ cm}\times 1\text{ cm}$ 的玉米叶片上, 待其自然干燥后饲喂幼虫, 连续饲喂 6 d , 喂食过程中处理的叶片不取出直至粘虫全部取食; 6 d 后, 用未经 RNA 微球处理过的新鲜玉米叶片继续饲喂幼虫, 直至粘虫种群指标的观察期结束。饲喂方法参照 Christiaens 等 (2018) 报道。本试验共设 3 次生物学重复, 每次重复饲喂 60 头幼虫。

1.2.5 RNA 微球处理后靶标基因的表达水平测定 分别于 RNA 微球处理后的 24、48 和 72 h , 从各处理组中随机挑选 5 头幼虫, 利用总 RNA 提取试剂盒 (武汉赛维尔生物科技有限公司) 提取供试幼虫的总 RNA, 并通过 SweScript All-in-One RT SuperMix for qPCR 反转录试剂盒合成 cDNA 第一链。根据 NCBI 中已登录的 *Msa-tubulin* 和 *Ms β -tubulin* 的核酸序列, 用 Primer premier 5.0 软件设计其 qPCR 引物, 内参基因 β -actin 的定量引物参考崔可佳 (2020) (表 1)。qPCR 反应参照 SYBR Green qPCR Master Mix 的说明书进行, 反应体系 ($20\text{ }\mu\text{L}$) 包括正反向引

物 ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$) 各 $0.5\text{ }\mu\text{L}$, SYBR Mix $10\text{ }\mu\text{L}$, cDNA 模板 $2\text{ }\mu\text{L}$, 无酶水 $7\text{ }\mu\text{L}$ 。反应置于 Bio-Rad CFX96TM Real-time PCR 检测仪上进行, 反应程序: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s ; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s , $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 10 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s , 40 个循环。每个处理组测定 3 个样品, 每个样品 3 次重复。根据 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法基因相对表达量 (Livak and Schmittgen, 2001)。

1.2.6 RNA 微球处理后粘虫生物学指标的观察 观察时间点参照 Jin 等 (2021) 报道, 于 RNA 微球处理的第 7 天测量存活幼虫的体长和体重。具体操作如下: 各处理组选取 10 头幼虫, 用电子天平称量 10 头幼虫的总重量并计算平均体重, 重复 3 次; 每组选取 10 头幼虫, 单独测量每头幼虫的体长。同时, 在生物测定试验中, 每 2 d 记录 1 次处理组中幼虫的存活率, 一共记录到第 14 天。每天观察幼虫的表型变化并在第 7 天拍照记录。

1.3 数据分析

数据分析及制图采用 IBM SPSS Statistics 23 和 GraphPad Prism 9 软件。核酸剩余百分比和基因表达水平的比较采用 *T* 检验, 粘虫体长和体重的比较采用单因素方差分析, 并选择 Tukey 氏 HSD 进行多重比较, 粘虫存活率的分析采用 Kaplan-Meier 方法, $P < 0.05$ 为显著性差异。

2 结果与分析

2.1 RNA 微球的制备和稳定性

通过琼脂糖凝胶电泳确认 RNA 微球的产生, 电泳图中是制备过程各步骤产物产生的条带 (图 1: A); 通过杂交和连接的过程成功产生了环状 DNA, 成环后的 DNA 比起线性 DNA 迁移速率变慢。滚环转录产物产生了较大范围的弥散条带, 其长度在 $25\text{--}500\text{ bp}$ 之间。动态光散射 (DLS) 分析结果表明, RNA 微球的水合平均粒径为 336.2 nm , 且粒径分布集中, 无杂峰产生 (图 1: B)。RNA 微球的稳定性结果表明, 孵育 $1\text{--}4\text{ h}$, RMS-*EGFP* 组降解速率明显慢于 siRNA-*EGFP* 组 ($P < 0.01$); 在孵育 4 h 后,

RMS-EGFP 组的核酸剩余百分比为 $60.8\% \pm 1.7\%$, 而 siRNA-EGFP 组的仅剩余 $11.5\% \pm 0.5\%$ (图 1: C)。说明 RMS-EGFP 在中肠液中具有

较好的稳定性, RNA 微球结构可以有效保护内部 siRNA, 从而提高其在昆虫摄入过程中的含量, 增加 RNAi 活性。

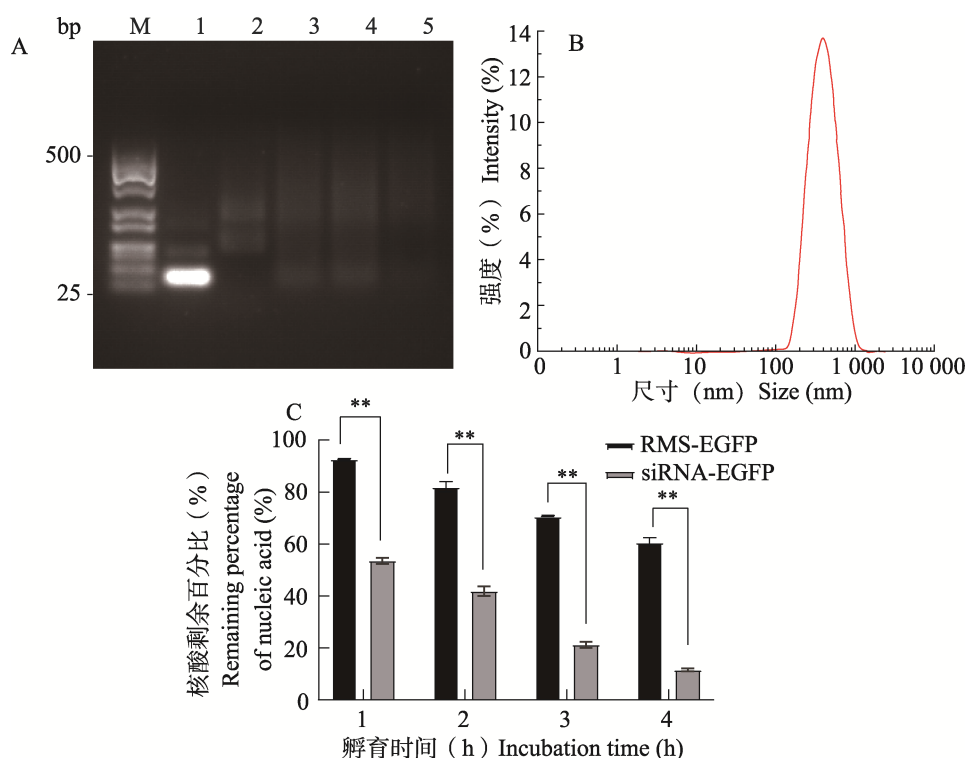


图 1 RNA 微球的制备和稳定性比较

Fig. 1 Preparation of RNA microsphere and stability comparison

A. 琼脂糖凝胶电泳确认 RNA 微球的产生; B. 动态光散射测量 RNA 微球的粒径; C. RNA 微球的稳定性研究。M: DNA 分子量标准 MARKER (25-500 bp); 1: 线性 DNA 模板和 T7 启动子的杂交产物; 2: 连接后的闭环产物; 3、4 和 5: 转录产物。图中数据为平均值 $\pm$ 标准误, 柱上星号表示两组之间差异显著 (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, 独立样本 t 检验)。图 2 同。

A. Agarose gel electrophoresis confirmed the production of RNA microspheres; B. The particle size of RNA microspheres measured by dynamic light scattering; C. Stability of RNA microspheres.

M: DNA Marker (25-500 bp); 1: Hybrid product of linear DNA template and T7 promoter;

2: Closed loop product after ligation; 3, 4 and 5: Transcription products; M: 25-500 bp marker.

Data in the figure are mean $\pm$ SE, asterisk above bars indicates significant difference between the two groups (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, independent sample t -test). The same for Fig. 2.

2.2 RNAi 后 *Msa-tubulin* 和 *Msb-tubulin* 基因的表达水平变化

qPCR 检测结果显示 (图 2), *Msa-tubulin* 和 *Msb-tubulin* 处理组的基因表达水平在 24 h 后显著下降, 与阴性对照组 RMS-EGFP 比较, 分别下降了 51.6% ($F = 1.122$, $P = 0.003$) 和 44.3% ($F = 0.121$, $P = 0.015$)。 *Msa-tubulin* 处理组在 48 h 后的表达量虽然下降 32.0% (与阴性对照组

RMS-EGFP 相比差异不显著; $F = 2.170$, $P = 0.170$), 但在 72 h 后的表达量急速攀升 (与阴性对照组 RMS-EGFP 相比显著上调 134.4%; $F = 0.125$, $P = 0.002$)。在 48 和 72 h 后, *Msb-tubulin* 处理组的表达量出现了上调现象, 与阴性对照组 RMS-EGFP 相比, 表达量分别上调了 120.5% ($F = 0.004$, $P = 0.134$) 和 129.0% ($F = 2.429$, $P = 0.078$), 但差异均不显著。

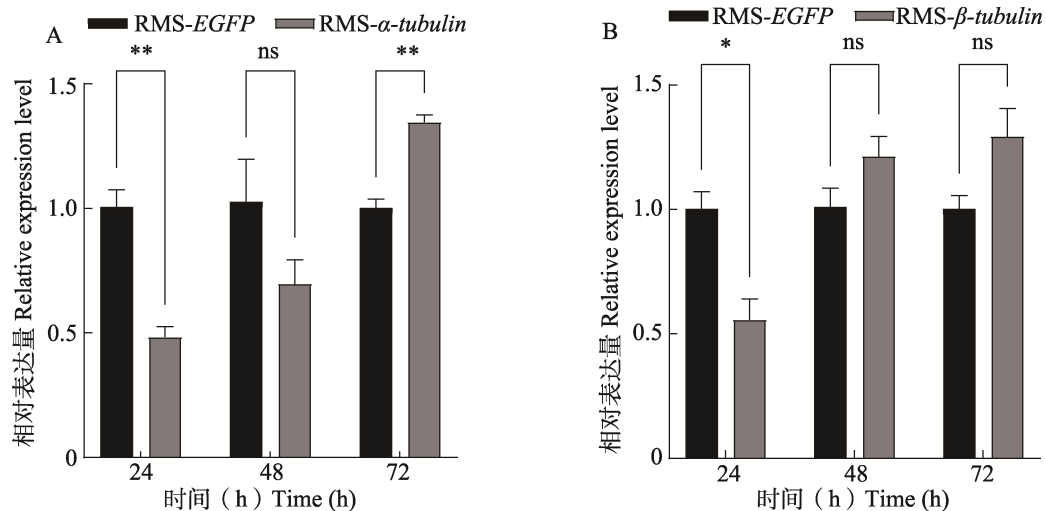


图2 饲喂粘虫幼虫 RNA 微球后 *Msa-tubulin* (A) 和 *Msβ-tubulin* (B) 基因的相对表达量
Fig. 2 The relative expression levels of *Msa-tubulin* (A) and *Msβ-tubulin* (B) genes in *Mythimna separata* larvae after feeding RNA microspheres

ns 表示没有显著性差异。ns means no significant difference.

2.3 RNA 微球对粘虫基因干扰的生物学效应

与 2 个对照组(空白对照组清水和阴性对照组 RMS-EGFP)相比,靶标基因 RNA 微球处理组的粘虫体重显著下降,但 2 个对照组之间没有显著性差异(RMS-*α-tubulin*: $F = 52.076$, $P < 0.01$; RMS-*β-tubulin*: $F = 45.728$, $P < 0.01$)(图 3)。与空白对照组清水相比, RMS-*α-tubulin* 和 RMS-*β-tubulin* 处理组中粘虫的平均体重分别下

降了 59.7% ($P < 0.01$) 和 58.0% ($P < 0.01$); 与阴性对照组 RMS-EGFP 相比, RMS-*α-tubulin* 和 RMS-*β-tubulin* 处理组中粘虫的平均体重分别下降了 51.1% ($P < 0.01$) 和 49.0% ($P < 0.01$)。

类似地,微管蛋白基因 RNA 微球处理组中的粘虫体长与 2 个对照组的相比,也都显著减少,但两个对照组之间无显著性差异(RMS-*α-tubulin*: $F = 173.614$, $P < 0.01$; RMS-*β-tubulin*: $F = 117.291$, $P < 0.01$)(图 4)。与空白对照组清水

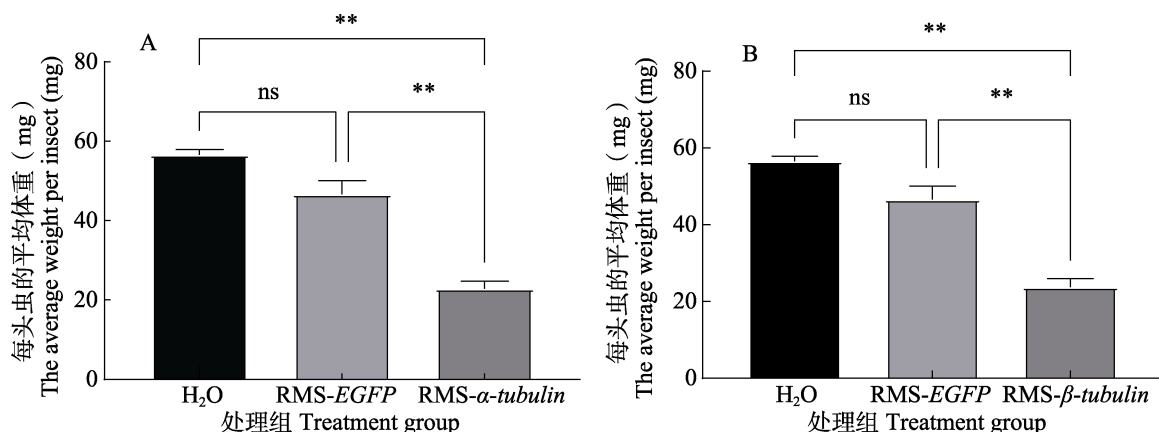


图3 饲喂 RMS-*α-tubulin* (A) 和 RMS-*β-tubulin* (B) 后粘虫体重的变化
Fig. 3 Changes in body weight of *Mythimna separata* after feeding RMS-*α-tubulin* (A) and RMS-*β-tubulin* (B)

柱上星号表示不同处理间差异显著 (** $P < 0.01$, Tukey 氏 HSD 检验),

ns 表示没有显著性差异 ($P > 0.05$, Tukey's HSD 检验)。图 4 同。

Histograms with asterisks indicate significant difference among different treatments (** $P < 0.01$, Tukey's HSD test),

ns means no significant difference ($P > 0.05$, Tukey's HSD test). The same for Fig. 4.

相比, RMS- α -tubulin 处理组的粘虫体长减少了 34.1% ($P < 0.01$), RMS- β -tubulin 处理组的减少了 31.6% ($P < 0.01$); 与阴性对照组 RMS-EGFP 相比, RMS- α -tubulin 处理组的粘虫体长减少了 34.9% ($P < 0.01$), RMS- β -tubulin 处理组的减少了 32.4% ($P < 0.01$)。

粘虫的致死表型与其体重、体长的变化趋势类似, 即靶标基因处理组与对照组之间产生了明显的差异。处理后第 7 天, RMS- α -tubulin 和 RMS- β -tubulin 处理组的粘虫都处于 4 龄阶段, 部分粘虫因蜕皮失败而死亡, 而 2 个对照组中的绝大部分粘虫已经成功蜕皮, 进入 5 龄阶段(图 5)。

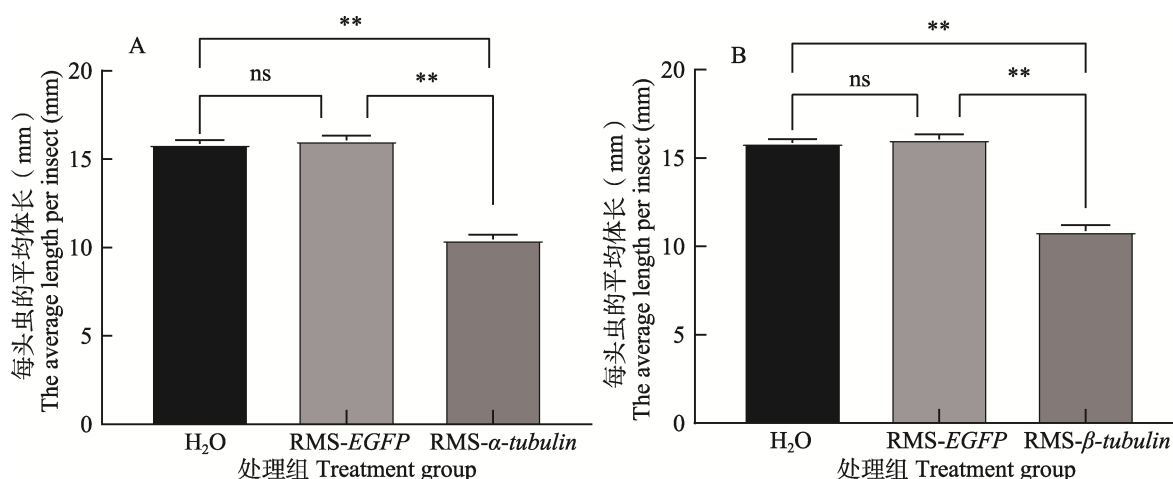


图 4 饲喂 RMS- α -tubulin (A) 和 RMS- β -tubulin (B) 后粘虫体长的变化

Fig. 4 Changes in body length of *Mythimna separata* after feeding RMS- α -tubulin (A) and RMS- β -tubulin (B)

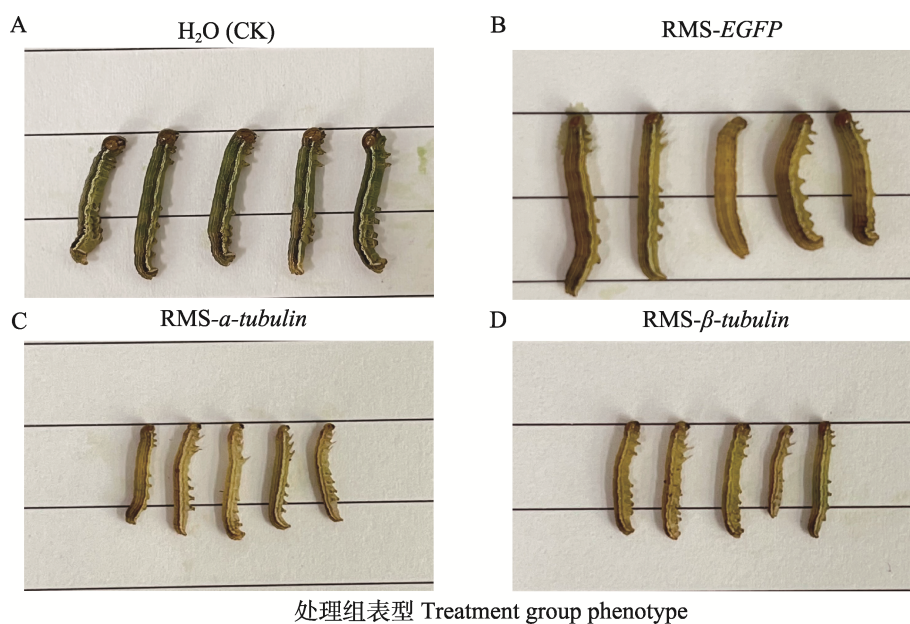


图 5 饲喂 RNA 微球后粘虫致死表型的变化

Fig. 5 Changes in lethal phenotypes of *Mythimna separata* after feeding RNA microspheres

A. 清水 (对照) H₂O (CK); B. RMS-EGFP; C. RMS- α -tubulin; D. RMS- β -tubulin.

饲喂粘虫微管蛋白基因 RNA 微球后的第 2 天, 处理组中有试虫开始死亡, 第 4 天

RMS- α -tubulin 和 RMS- β -tubulin 处理组的粘虫死亡率分别达到 11.1% 和 6.7%, 第 8 天分别达到

22.2%和 20.0%，第 12 天分别达到 37.8%和 40.0%，到第 14 天时，2 个处理组的粘虫死亡率均达到 42.2%，显著高于对照组 ($P < 0.01$) (图 6)。以上结果表明，经 RNA 微球处理后，粘虫表现出明显的发育抑制或延缓，甚至出现死亡现象 ($F = 3, P < 0.01$)。

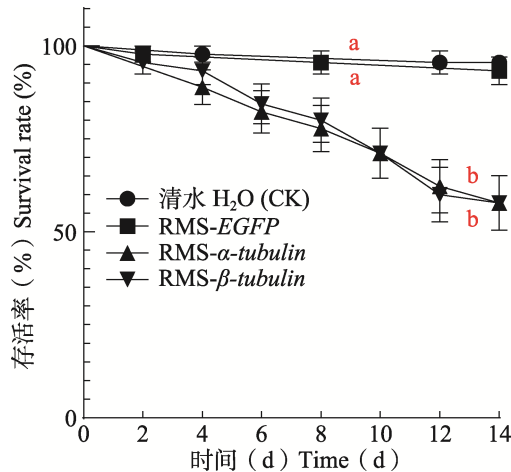


图 6 RNA 微球处理 14 d 内粘虫的生存曲线

Fig. 6 Survival curve of *Mythimna separata* treated with RNA microspheres within 14 d

折线上不同字母代表相应曲线与对照组差异显著 ($P < 0.01$, log-rank)。

The different letters on the line represent significant difference between the corresponding curve and the control group ($P < 0.01$, log-rank).

3 讨论

siRNA 递送策略的开发技术，是提高害虫 RNAi 效率的主要手段之一。近年来，越来越多的载体被用来向害虫递送 siRNA，这些载体已经被证明能够在多种昆虫中提高 RNAi 的有效性与干扰效果，包括棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Kolge *et al.*, 2021)、新热带区褐臭蝽 *Euschistus heros* (Castellanos *et al.*, 2019)、棉蚜 *Aphis gossypii* (Wei *et al.*, 2021) 和草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* (Dhandapani *et al.*, 2022) 等。然而，这种额外添加的载体多数是阳离子聚合物或脂质体，其面临着操作繁琐、成本高以及容易产生免疫和细胞毒性的问题 (Hunter, 2006)。因此，建立一种安全、简便、低成本且高效的 siRNA

递送系统十分重要。本研究采用的滚环转录酶促 RNA 合成方法是一种低成本、高效益的 RNA 合成方法 (Wang *et al.*, 2019)。通过简单的三步法，便可制备滚环转录 RNA 微球，并且一次转录就能产生分子量范围在 25-500 bp 之间的 siRNA 聚合物 (图 1)，这与先前的研究中单个微球含有大量 siRNA 拷贝的结论一致 (Lee *et al.*, 2012)。大量的 siRNA 拷贝对提升粘虫 RNAi 效率是至关重要的，主要缘于鳞翅目昆虫本身缺乏明显的沉默扩增机制 (Ivashuta *et al.*, 2015)。除了产生能够发挥 RNAi 效应的核酸本身，滚环转录产生的微球结构也是一种有力的 siRNA 递送工具，其稳定性研究表明 RNA 微球在粘虫中肠液中的降解速率慢于未被包载的 siRNA，能够有效缓解 siRNA 的过早降解。此外，RNA 微球的制备过程不需要额外添加任何载体，能够减轻产生细胞毒性的风险。

本研究中使用基于滚环转录技术的 siRNA 递送策略，能够成功触发粘虫靶标基因的沉默，抑制幼虫体重、体长并引起粘虫明显的死亡。RMS- α -tubulin 和 RMS- β -tubulin 处理组的粘虫靶标基因表达量在 24 h 分别下降了 51.6% 和 44.3%，但在 48 和 72 h 出现了反向上调的现象，这可能是因为 siRNA 被摄入粘虫体内时，会诱导粘虫免疫反应 (这种免疫反应类似于昆虫对某种外源病原体的应激响应)；当该基因产生的应激响应的上调强度大于 RNAi 的应激反应强度时，该基因不会被相应的 siRNA 沉默，甚至会出现反向上调的情况 (Guan *et al.*, 2018)。此外，靶基因间 RNAi 效率的差异也会受基因功能的影响 (Terenius *et al.*, 2011)。粘虫哪些基因功能最有可能产生有效的 RNAi 反应，哪些粘虫结合蛋白和具有转运活性的蛋白难以被沉默，哪些粘虫免疫基因对 RNAi 特别敏感？这些科学问题，有待进一步探讨。

作为一种细胞内物质的转运蛋白，微管蛋白可能对粘虫的 RNAi 不够敏感。现有的微管蛋白的 RNAi 研究，均表现出了对靶标害虫具有较强的亚致死和致死效应。就粘虫而言，本研究发现，饲喂 RMS- α -tubulin 或 RMS- β -tubulin 后，幼虫

的体重分别减少 59.7% 和 58.0% (图 2), 这与前人的报道类似。例如, Wang 等 (2018) 报道, 摄入 *dsMsa-tubulin* 或 *dsMsβ-tubulin* 后, 粘虫体重分别降低了 21.3% 和 41.9%。RNA 微球处理后, 靶标害虫的致死表型可能因害虫种类不同而不同。本研究结果显示, RNA 微球处理后第 2 天, 粘虫就会出现死亡症状 (图 5), 而德国小蠊 *Blattella germanica* 经微管蛋白基因的双链 RNA 注射后第 17 天才出现死亡症状 (Lin *et al.*, 2017)。本研究中 2 个微管蛋白基因导致的粘虫死亡率与对照组相比最高分别增加了 37.8% (*RMS-α-tubulin*) 和 35.6% (*RMS-β-tubulin*), 而在先前粘虫的 RNAi 研究中, 饲喂细菌表达的 *dsChi1* 和 *dsChi2*, 其增长死亡率仅达到 16.7% (Ganbaatar *et al.*, 2017)。

本研究在粘虫中成功建立了基于滚环转录技术的 siRNA 递送策略, 将制备的靶标基因 RNA 微球饲喂给粘虫, 能较好地抑制 *Msa-tubulin* 和 *Msβ-tubulin* 基因的表达; 此外, *Msa-tubulin* 和 *Msβ-tubulin* 被成功干扰后, 粘虫的体重、体长均显著下降, 生长发育明显受到抑制, 幼虫死亡率显著增大。以上研究结果证实该递送策略能够成功触发粘虫的 RNAi 响应。本研究通过建立基于 RNA 微球的 siRNA 递送系统, 探索了 siRNA 微球介导的粘虫干扰效果。研究结果为 siRNA 微球在粘虫 RNAi 中的应用提供了重要的理论基础, 同时也为鳞翅目害虫的 RNAi 绿色防控提供了新的思路。鉴于 RNA 微球的低成本和易于制备, 该新型 siRNA 递送系统可用于快速筛选害虫的致死靶标基因, 在害虫 RNAi 研究中具有巨大的应用潜力。然而, 不同靶标基因导致的害虫的 RNAi 效率和干扰效果存在差异。为此, 本递送策略还需要进一步仔细选择 RNAi 的靶标基因, 以提升对粘虫等鳞翅目害虫的防控效果。

参考文献 (References)

Castellanos NL, Smaghe G, Sharma R, Oliveira EE, Christiaens O, 2019. Liposome encapsulation and EDTA formulation of dsRNA targeting essential genes increase oral RNAi-caused mortality in the Neotropical stink bug *Euschistus heros*. *Pest Management Science*, 75(2): 537–548.

- Cooper AMW, Yu ZT, Biondi M, Song HF, Silver K, Zhang JZ, Zhu KY, 2020. Stability of double-stranded RNA in gut contents and hemolymph of *Ostrinia nubilalis* larvae. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 169: 104672.
- Cui KJ, 2020. Study on silencing efficiency of chitin synthase A in *Mythimna separata* by maize-mediated RNA interference. Master dissertation. Taiyuan: Shanxi Normal University. [崔可佳, 2020. 玉米介导 RNAi 技术沉默粘虫 chitin synthase A 基因的有效性研究. 硕士学位论文. 太原: 山西师范大学.]
- Christiaens O, Tardajos MG, Martinez Reyna ZL, Dash M, Dubruel P, Smaghe G, 2018. Increased RNAi efficacy in *Spodoptera exigua* via the formulation of dsRNA with guanylated polymers. *Frontiers in Physiology*, 9(4): 316.
- Duan Y, Chen Q, Miao J, Dong JX, Wang GP, Wu YQ, 2023. Dynamics and population characteristics of *Mythimna separata* and *Mythimna loreyi* in Yuanyang, Henan Province. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 60(3): 1–8. [段云, 陈琦, 苗进, 董嘉欣, 王高平, 武予清, 2023. 河南原阳东方粘虫和劳氏粘虫发生动态与虫源性质分析. 应用昆虫学报, 60(3): 1–8.]
- Dhandapani RK, Gurusamy D, Palli SR, 2022. Protamine-lipid-dsRNA nanoparticles improve RNAi efficiency in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(22): 6634–6643.
- Fan D, Qin SB, Piao DH, Xu YL, 2008. Cloning and sequence analysis of two types of tubulin genes from the armyworm, *Mythimna separata* Walker. *Plant Protection*, 34(4): 40–45. [樊东, 秦松柏, 朴冬花, 许艳丽, 2008. 黏虫体内两种微管蛋白基因 cDNA 序列的克隆与序列分析. 植物保护, 34(4): 40–45.]
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC, 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669): 806–811.
- Guan RB, Li HC, Miao XX, 2018. Prediction of effective RNA interference targets and pathway-related genes in lepidopteran insects by RNA sequencing analysis. *Insect Science*, 25(3): 356–367.
- Ganbaatar O, Cao BD, Zhang YN, Bao DR, Bao WH, Wuriyangan H, 2017. Knockdown of *Mythimna separata* chitinase genes via bacterial expression and oral delivery of RNAi effectors. *BMC Biotechnology*, 17(1): 9.
- Hammond JW, Cai DW, Verhey KJ, 2008. Tubulin modifications and their cellular functions. *Current Opinion in Cell Biology*, 20(1): 71–76.
- Hunter AC, 2006. Molecular hurdles in polyfectin design and mechanistic background to polycation induced cytotoxicity. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(14): 1523–1531.
- Ivashuta S, Zhang YJ, Wiggins BE, Ramaseshadri P, Segers GC, Johnson S, Meyer SE, Kerstetter RA, McNulty BC, Bolognesi R,

- Heck GR, 2015. Environmental RNAi in herbivorous insects. *Rna-a Publication of the Rna Society*, 21(5): 840–850.
- Jang M, Kim JH, Nam HY, Kwon IC, Ahn HJ, 2015. Design of a platform technology for systemic delivery of siRNA to tumours using rolling circle transcription. *Nature Communications*, 6(1): 7930.
- Jiang XF, Zhang L, Cheng YX, Luo LZ, 2014. Novel features, occurrence trends and economic impact of the oriental armyworm, *Mythimna separata* (Walker) in China. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 51(6): 1444–1449. [江幸福, 张蕾, 程云霞, 罗礼智, 2014. 我国粘虫粘虫发生危害新特点及趋势分析. 应用昆虫学报, 51(6): 1444–1449.]
- Jin HH, Abouzaid M, Lin YJ, Hull JJ, Ma WH, 2021. Cloning and RNAi-mediated three lethal genes that can be potentially used for *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae) management. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 174(3): 104828.
- Joga MR, Zotti MJ, Smagghe G, Christiaens O, 2016. RNAi efficiency, systemic properties, and novel delivery methods for pest insect control: What we know so far. *Frontiers in Physiology*, 7(11): 553.
- Kim YM, Lee YS, Kim T, Yang K, Nam K, Choe D, Roh YH, 2020. Cationic cellulose nanocrystals complexed with polymeric siRNA for efficient anticancer drug delivery. *Carbohydr Polymers*, 247(11): 116684.
- Kolge H, Kadam K, Galande S, Lanjekar V, Ghormade V, 2021. New frontiers in pest control: Chitosan nanoparticles-shielded dsRNA as an effective topical RNAi spray for gram podborer biocontrol. *ACS Applied Bio Materials*, 4(6): 5145–5157.
- Kunte N, McGraw E, Bell S, Held D, Avila LA, 2020. Prospects, challenges and current status of RNAi through insect feeding. *Pest Management Science*, 76(1): 26–41.
- Lee JB, Hong J, Bonner DK, Poon Z, Hammond PT, 2012. Self-assembled RNA interference microsponges for efficient siRNA delivery. *Nature Materials*, 11(4): 316–322.
- Lee JH, Ku SH, Kim MJ, Lee SJ, Kim HC, Kim K, Kim SH, Kwon IC, 2017. Rolling circle transcription-based polymeric siRNA nanoparticles for tumor-targeted delivery. *Journal of Controlled Release*, 263(10): 29–38.
- Lin YH, Huang JH, Liu Y, Belles X, Lee HJ, 2017. Oral delivery of dsRNA lipoplexes to German cockroach protects dsRNA from degradation and induces RNAi response. *Pest Management Science*, 73(5): 960–966.
- Liu Y, Yang J, Yao L, Li SY, Chen YR, Yang HJ, Fan D, 2020. Chitin deacetylase: A potential target for *Mythimna separata* (Walker) control. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 104(1): e21666.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Lu XP, Liu JH, Fu XY, Wang FJ, Wu H, Weng H, Ma ZQ, 2021. Effects of RNAi-mediated plasma membrane calcium transporting ATPase and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor gene silencing on the susceptibility of *Mythimna separata* to wilforine. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 227(12): 112909.
- Nandety RS, Kuo YW, Nouri S, Falk BW, 2015. Emerging strategies for RNA interference (RNAi) applications in insects. *Bioengineered*, 6(1): 8–19.
- Nielsen MG, Gadagkar SR, Gutzwiller L, 2010. Tubulin evolution in insects: Gene duplication and subfunctionalization provide specialized isoforms in a functionally constrained gene family. *Bmc Evolutionary Biology*, 10(4): 113.
- Smith RC, Walter MF, Hice RH, O'Brochta DA, Atkinson PW, 2007. Testis-specific expression of the $\beta 2$ tubulin promoter of *Aedes aegypti* and its application as a genetic sex-separation marker. *Insect Molecular Biology*, 16(1): 61–71.
- Song YQ, Wang HT, Chen, YG, Wang, SY, Sun, HZ, 2017. Cross-resistance and biochemical resistance mechanisms of emamectin benzoate resistant population of *Mythimna separate*. *Journal of Pesticide Science*, 19(1): 18–24. [宋月芹, 王海涛, 陈玉国, 王圣印, 孙会忠, 2017. 粘虫抗甲氨基阿维菌素苯甲酸盐种群的交互抗性生与生化抗性机制. 农药学报, 19(1): 18–24.]
- Terenius O, Papanicolaou A, Garbutt JS, Eleftherianos I, Huvenne H, Kanginakudru S, Albrechtsen M, An CJ, Aymeric JL, Barthel A, 2011. RNA interference in Lepidoptera: An overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. *Journal of Insect Physiology*, 57(2): 231–245.
- Wang JD, Wang YR, Wang YZ, Wang WZ, Wang R, Gao SJ, 2018. RNA interference of tubulin genes has lethal effects in *Mythimna separate*. *Gene*, 670: 1–6.
- Wang TF, Hong SN, Luo Y, Lv HY, Zhang Y, Pei RJ, 2019. Self-assembled saRNA delivery system based on rolling circle transcription for aptamer-targeting cancer therapy. *ACS Applied Bio Materials*, 2(11): 4737–4746.
- Wei LY, Zhang LJ, Liu N, Gao XW, Liu XN, 2021. Effect of RNAi targeting *CYP6CY3* on the growth, development and insecticide susceptibility of *Aphis gossypii* by using nanocarrier-based transdermal dsRNA delivery system. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 177(8): 104878.
- Wittrup A, Lieberman J, 2015. Knocking down disease: A progress report on siRNA therapeutics. *Nature Reviews Genetics*, 16(9): 543–552.