



杨壹,周茂超,杨纪潇,唐滔,赵弘巍,牛冬冬. 原核表达 dsRNA 发酵条件、提取方法优化及应用[J]. 中国农业大学学报, 2025, 30(11): 14-26.
YANG Yi, ZHOU Maochao, YANG Jixiao, TANG Tao, ZHAO Hongwei, NIU Dongdong. Optimization and application of the fermentation conditions and extraction methods for prokaryotic dsRNA expression[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2025, 30(11): 14-26.
DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2025.11.02

原核表达 dsRNA 发酵条件、提取方法优化及应用

杨 壹 周茂超 杨纪潇 唐 滔 赵弘巍 牛冬冬*

(南京农业大学 植物保护学院/农林生物安全全国重点实验室, 南京 210095)

摘 要 为优化原核表达系统中双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA) 的发酵条件和提取方法, 并探讨其在水稻纹枯病防治中的应用潜力, 通过构建靶向水稻纹枯病 *RsDCL1/2* 基因的重组发夹结构表达载体, 并导入大肠杆菌 HT115 (DE3) 菌株中, 通过对 pH、IPTG 诱导浓度、诱导温度转速、诱导时间、NaCl 浓度进行调整优化, 筛选出最佳发酵条件以提高 dsRNA 产量; 并评估 Trizol 法、RNAswift 法、75% 乙醇固定法及 PB 缓冲裂解法 4 种提取方法对 dsRNA 的提取效率, 采用最适提取方法对提取的 dsRNA 开展水稻纹枯病的温室防治效果验证。结果表明: 1) 经优化后的发酵条件为 pH 7, 0.4 mmol/L IPTG, 33 °C, 160 r/min, 7.5 g/L NaCl, 发酵时间 12 h, 该发酵条件下获得的 dsRNA 产量比优化前增加 1.32 倍; 2) 在提取方法比较中, PB 缓冲裂解法在产量和纯度方面表现最佳, 产量是 75% 乙醇固定法的 3.89 倍; 3) 温室盆栽防效试验表明, PB 缓冲裂解法提取的 dsRNA 喷施水稻后, 显著降低病斑的面积, 进一步验证了 dsRNA 作为生物农药在水稻纹枯病防治中的潜力。综上, 基于优化发酵条件和 PB 缓冲裂解法 2 种方式构建的 dsRNA 生产体系, 可有效提高 dsRNA 的产量; 同时, 该体系产出的 dsRNA 在水稻纹枯病的防治中表现出良好的应用效果。

关键词 dsRNA; 发酵条件; dsRNA 提取方法; 水稻纹枯病

中图分类号 S432.1

文章编号 1007-4333(2025)11-0014-13

文献标志码 A

Optimization and application of the fermentation conditions and extraction methods for prokaryotic dsRNA expression

YANG Yi, ZHOU Maochao, YANG Jixiao, TANG Tao, ZHAO Hongwei, NIU Dongdong*

(College of Plant Protection/State Key Laboratory of Agro-Biological Safety,
Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract To optimize the fermentation conditions and extraction methods for double-stranded RNA (dsRNA) in a prokaryotic expression system and evaluate its potential for controlling rice sheath blight (*Rhizoctonia solani*), a recombinant hairpin expression vector targeting the *RsDCL1/2* genes of *R. solani* was constructed and transformed into *Escherichia coli* HT115(DE3). Six fermentation parameters (pH, IPTG concentration, induction temperature, agitation speed, duration, and NaCl concentration) were systematically optimized. The results showed that the highest dsRNA yield (1.32-fold increase over pre-optimization levels) was achieved under the following conditions: pH 7, 0.4 mmol/L IPTG, 33 °C, 160 r/min, 7.5 g/L NaCl, and 12 h induction. Comparative analysis of four extraction methods (Trizol, RNAswift, 75% ethanol fixation, and PB buffer lysis) demonstrated that PB buffer lysis yielded 3.89 times more dsRNA than 75% ethanol fixation while maintaining superior purity. In greenhouse trials, the application of PB-extracted dsRNA foliar significantly reduced the lesion area on rice leaves, confirming the potential dsRNA as a biopesticide in the prevention and control of rice sheath blight.

收稿日期: 2024-12-23

基金项目: 国家高层次人才项目

第一作者: 杨壹 (ORCID: 0009-0002-7540-1450), 硕士研究生, E-mail: Yangyi992025@163.com

通讯作者: 牛冬冬 (ORCID: 0000-0002-9926-0923), 教授, 主要从事 RNA 沉默调控机制及病害绿色防控研究, E-mail: ddniu@njau.edu.cn

Collectively, the integrated dsRNA production system combining optimized fermentation and PB buffer lysis not only enhanced dsRNA yield but also exhibited promising field-applicable potential for sustainable management of rice sheath blight.

Keywords dsRNA; optimization of fermentation conditions; dsRNA extraction methods; rice sheath blight

喷雾诱导基因沉默(spray induced gene silencing, SIGS)是近些年发展的植物绿色防控新技术,是将 dsRNA 喷洒于病虫害表面并被病虫害直接或间接地吸收至细胞内,从而沉默靶标基因的表达,达到控制病虫害的目的^[1]。基于 SIGS 技术的 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)农药创制被誉为“农药史上第三次革命”,具有靶向强、效率高、无污染等优点^[2]。在真核生物中,双链 RNA(dsRNA)被 Dicer-like(DCL)酶切割为双链 siRNA(small interfering RNA),与 Argonaute(AGO)结合形成 RNA 诱导的沉默复合体(RNA-Induced Silencing Complex, RISC),通过切割靶标 mRNA 或者抑制其翻译^[3]。DCL 蛋白是 RNAi 通路中的关键酶,在基因表达调控和病原菌致病中发挥着重要作用^[4]。以灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)为例,其 *BcDCL1/2* 基因被敲除后,病原菌毒力和生长能力显著下降,这一发现揭示了 DCL 基因在病原菌致病机制中的关键作用^[5]。经后续研究发现通过喷施靶向 *BcDCL1/2* 的 dsRNA 的水果、蔬菜、花瓣等均可有效防控灰霉病^[6],验证了 RNAi 的应用潜力。SIGS 除对灰葡萄孢菌具有显著的防治效果,在防治禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)^[7]、葡萄霜霉病菌(*Plasmopara viticola*)^[8]、稻瘟病菌(*Magnaportheoryzae*)^[9]及其他多种病原菌方面也具有重要的应用前景。通过 RNA 干扰技术开发的 RNA 生物农药能够特异性且持续地降低昆虫和真菌对植物的侵害^[10],其高效无污染、靶向性强及环境相容性佳等优势,对于推动农业领域绿色农药的可持续发展具有重要的实践意义。

目前, RNA 生物农药仍处于发展的初期阶段,在大田应用中还存在量产成本高、递送效率低以及稳定性不足等问题^[11]。dsRNA 的制备主要依赖于化学合成、微生物表达以及无细胞合成技术。化学合成成本较高,仅限于小规模的生产应用。早期通过微生物发酵制备 dsRNA 的成本约为体外转录试剂盒生产成本的 1/4^[12],随着系统的不断完善,有企业宣称生产 dsRNA 的成本已经能达到 2 美元/g^[11]。无细胞合成是目前获悉的企业报道中生产 dsRNA 成本最低的方式, dsRNA 的生产成本仅为 1 美元/g^[13]。然而,这一过程需要多种酶的辅助,依

赖于专业的供应链。尽管如此,基于微生物发酵和无细胞合成的 dsRNA 生产在田间防治方面具有广阔的应用前景,已成为 RNA 生物农药合成的研究热门方向^[14-15]。

微生物表达合成 dsRNA 的系统中,大肠杆菌因其清晰的遗传背景、快速生长和易于操作的特点,广泛应用于 dsRNA 的生产^[16]。例如,利用 HT115(DE3)生产的以黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus, CMV)为靶点的 dsRNA 能有效保护黄瓜叶片免受病毒侵染,有效保护期最长可达 24 d^[17]。将含有针对黄曲霉和灰霉菌的 dsRNA 的细菌 HT115(DE3)自溶物分别施用于玉米种子以及本氏烟叶片时,能有效抑制病原菌的生长和毒素的累积^[18]。除此以外, RNA 农药的生产还可通过谷氨酸棒杆菌^[19]、苏云金芽胞杆菌^[20]、丁香假单胞菌^[21]等其他微生物底盘得以实现。dsRNA 的提取纯化是 RNA 农药生产中的重要环节,目前 dsRNA 的提取主要依赖于 Trizol 法^[22]、75% 乙醇沉淀法^[23-24]以及 RNAswift^[25]等技术,但这些方法存在一些局限性,如操作复杂、成本较高等问题。因此,迫切需要开发一种既经济高效又能够保证提取质量的 dsRNA 提取新方法。

水稻(*Oryza sativa* L.)是全球重要的粮食作物之一,由立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)引起的水稻纹枯病是水稻生产上的重要病害之一,已在亚洲、非洲、欧洲、美洲等水稻种植地区广泛蔓延^[26]。据全国农业技术推广服务中心统计,我国纹枯病发病趋势较重,特别是在西南、华南、长江中下游等稻区影响更甚,预计 2025 年该病害的受影响面积达到 2.4 亿亩次^[27]。目前水稻纹枯病的防治主要依赖于药剂的应用,比较常用的杀菌剂包括井冈霉素、多菌灵、代森锰锌等^[28-30]。然而,对杀菌剂的长期或不规范使用可能导致病原菌产生抗药性及环境污染等问题^[31]。因此,迫切需要采用可持续的、绿色环保的防治手段保障粮食生产安全。

兰驰^[32]研究发现,靶向立枯丝核菌 *RsDCL1* 和 *RsDCL2* 基因的 dsRNA 能通过干扰菌丝生长和侵染垫结构,从而减弱其致病力,有效抑制水稻纹枯

病的发生。可见, *DCL* 基因是防治水稻纹枯病的 RNAi 生物农药理想的靶标, 为作物真菌病害绿色防控提供了新策略, 但如何实现 dsRNA 的规模化发酵及提取还需要进一步研究。本研究通过设计并构建基于靶向水稻纹枯病关键基因 *RsDCL1/2* 的重组发夹结构表达载体, 并将其导入了 RNaseIII 缺陷型表达载体的大肠杆菌 HT115(DE3) 菌株, 利用该大肠杆菌原核表达生产系统, 探索了产生 dsRNA 的最佳发酵条件, 并对不同的 dsRNA 提取方法进行评估, 以期获得 dsRNA 高产的最佳诱导条件, 此外, 还通过温室盆栽防效试验验证了获得的 dsRNA 对水稻纹枯病的防治效果, 旨在探究 dsRNA 作为生物农药在水稻纹枯病防治中的应用潜力, 以期为水稻纹枯病的绿色防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

大肠杆菌 HT115(DE3) 购于上海唯地生物技术有限公司; 大肠杆菌 DH5 α , pET28a, *LOOP* 由本实验室保存; *RsDCL1/2*, 由实验室保存的 DH5 α -pMD19-T 载体上扩增。

1.2 试验设计

1.2.1 pET28a-*RsDCL1/2* 发夹结构载体构建

以 pMD19-T 载体为模板, 利用引物(表 1) 扩增 400 bp 的 *RsDCL1/2* 的正义链(产物 1) 与反义链(产

物 2)。以 *LOOP* DNA 片段为模板, 利用引物(表 1) 扩增 136 bp 的 *LOOP* 基因序列(产物 3)。以产物 1 和产物 3 为模板, 利用引物 *RsDCL1/2*-L-F 和 *LOOP*-R 扩增 536 bp 的 *RsDCL1/2*+*LOOP* 基因序列(产物 4)。

用 1% 琼脂糖凝胶电泳检查 PCR 产物, 并使用凝胶回收试剂盒(Thermo Scientific)回收目的 PCR 产物, 分别将回收纯化的 PCR 产物 4 与 pET 28a 载体使用限制性核酸内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切, 随后将切好的片段连接并转化至大肠杆菌 DH 5 α 。将转化产物涂布于含有卡那霉素抗性 (50 μ g/mL) 的 LB 固体培养基平板上, 挑选单菌落摇菌, 并进行菌液 PCR 检测, 筛选阳性克隆后送测序。将测序正确的重组质粒命名为 p28-L+*LOOP*。分别将重组质粒 p28-L+*LOOP* 和回收纯化的 PCR 产物 2 使用限制性核酸内切酶 *Hind* III 和 *Xho* I 双酶切, 随后将切好的片段连接并转化至大肠杆菌 DH5 α 。将转化产物涂布于含有卡那霉素 (50 μ g/mL) 和四环素抗性 (12.5 μ g/mL) 的 LB 固体培养基平板上, 挑选单菌落摇菌, 随后提取质粒并使用限制性核酸内切酶 *Hind* III 和 *Xho* I 双酶切, 将酶切得到的片段进行回收纯化后送测序。将含正确测序片段的质粒命名为 pET28a-*RsDCL1/2*, 同时将 pET28a-*RsDCL1/2* 转化至大肠杆菌 HT115 (DE3)。

表 1 本研究所使用的引物
Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 (5'→3') Primer sequence	用途 Usage
<i>RsDCL1/2</i> -L-F	<u>GGAATTCCAATATCGCTCGATGGATCC</u>	<i>RsDCL1/2</i> 正义链 片段扩增
<i>RsDCL1/2</i> -L-R	<u>GGCAAGAAGAAAGGCTCACGTTGACCTCTTGCCATGAT</u>	
<i>LOOP</i> -F	<u>ATCATGGCAAGAGGTCAACGTGAGCCTTTCTTCTTGCC</u>	<i>LOOP</i> 片段扩增
<i>LOOP</i> -R	<u>CCCAAGCTTCTGTGTGTTTTGAACAATTTTAC</u>	
<i>RsDCL1/2</i> -R-F	<u>CCCAAGCTTGTTGACCTCTTGCCATGATA</u>	<i>RsDCL1/2</i> 反义链 片段扩增
<i>RsDCL1/2</i> -R-R	<u>CCGCTCGAGCAATATCGCTCGATGGATCC</u>	

注: 下划线部分为酶切位点; 加粗部分为同源臂。
Note: The underlined sequences indicate the restriction enzyme sites, and the bolded sequences represent homologous arms.

1.2.2 含重组质粒的菌液 dsRNA 表达诱导

将含有 pET28a-*RsDCL1/2* 重组质粒的大肠杆菌 HT115(DE3) 在含卡那霉素 (50 μ g/mL) 和四环素抗性 (12.5 μ g/mL) 的 LB 固体培养基平板划线, 37 $^{\circ}$ C 恒温培

养过夜。挑取单菌落加入到 5 mL 上述相同抗生素 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 200 r/min 振荡培养过夜。吸取初培液以 1:50 (V/V) 体积比加入 100 mL 上述相同抗生素 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 200 r/min 扩培 3 h 至

$OD_{600}=0.6$ 。在灭菌的超净台中以 1:1 000(V/V)加入终浓度为 0.6 mmol/L 的无菌异丙基硫代半乳糖苷(Isopropyl β -D-Thiogalactoside, IPTG),继续诱导 6 h。

1.2.3 原核表达 dsRNA-RsDCL1/2 发酵条件优化
以 dsRNA 表达水平作为评价指标,将表达菌株

接种至含 50 μ g/mL 卡那霉素和 12.5 μ g/mL 四环素的 LB 液体培养基,依次对 pH、IPTG 诱导浓度、诱导温度、诱导转速、诱导时间、NaCl 浓度 6 个自变量进行单因素试验,探究 dsRNA 表达菌株的最佳诱导表达体系,见表 2。

表 2 诱导体系单因素试验设计
Table 2 Single-variable experimental design for the induction system

诱导因素 Induction parameter	梯度范围 Gradient range
pH	4.5、5.5、6.5、7.0、8.0、8.5
IPTG 浓度/(mmol/L) IPTG concentration	1.0、0.8、0.6、0.4、0.2、0.1
温度/℃ Temperature	25、29、33、37、41、45
转速/(r/min) Speed	140、160、180、200、220、240
诱导时间/h Induction time	2、4、6、8、10、12、14、16
NaCl 浓度/(g/L) NaCl concentration	10.00、7.50、5.00、2.05、1.25

1.2.4 dsRNA 提取方法优化

Trizol 法(TR):取 50 mL 诱导菌液,8 000 r/min 离心 8 min,弃上清。菌体沉淀通过涡旋震荡彻底重悬于 1 mL Trizol,加入 200 μ L 氯仿,涡旋震荡,冰上静置 5 min 至液体分层。4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min 离心 15 min,吸上清于新的无酶 EP 管中。上清加入等体积异丙醇,颠倒均匀,−20 $^{\circ}$ C 沉淀 3 h。4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min 离心 20 min。沉淀加入 1:1(V/V) 75% 乙醇,4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min 离心 5 min,重复 2 次。沉淀风干 15 min 后,加入 DEPC ddH₂O 溶解 RNA。−80 $^{\circ}$ C 保存备用。前期发酵条件优化主要以该方法提取获得的 dsRNA。

RNA swift(RS):参照 Nwokeoji 等^[25]的方法进行操作。取 50 mL 诱导菌液,8 000 r/min 离心 8 min,弃上清。菌体沉淀通过涡旋震荡彻底重悬于 5 mL 裂解液(4% SDS pH 7.5、0.5 mmol/L NaCl),90 $^{\circ}$ C 加热 4 min,以 8 000 r/min 离心 6 min,吸上清于新的无酶 EP 管中。上清加入 7.5 mL 1 mol/L 盐酸胍和 2 mL 5 mol/L NaCl,室温静置 10 min。4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min 离心 15 min,吸上清于新的无酶 EP 管中。上清加入等体积异丙醇,颠倒均匀,−20 $^{\circ}$ C 沉淀 3 h。4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min 离心 20 min。沉淀加入 1:1(V/V) 75% 乙醇,4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min 离心 5 min,重复 2 次。沉淀风干 15 min 后,加入 DEPC ddH₂O 溶解 RNA。−80 $^{\circ}$ C 保存备用。

75% 乙醇固定法(AH):参照 Posiri^[23]的方法进行操作。取 50 mL 诱导菌液在 80 $^{\circ}$ C 条件下加热 20 min,8 000 r/min 离心 5 min。菌体沉淀重悬于 75% 乙醇(以 PBS 制备),4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min 离心 5 min。菌体沉淀重悬于 150 mmol/L NaCl,4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min 离心 5 min,吸上清于新的无酶 EP 管中。上清加入等体积异丙醇,颠倒均匀,−20 $^{\circ}$ C 沉淀 3 h。4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min 离心 20 min。沉淀加入 1:1(V/V) 75% 乙醇,4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min 离心 5 min,重复 2 次。沉淀风干 15 min 后,加入 DEPC ddH₂O 溶解 RNA。−80 $^{\circ}$ C 保存备用。

PB 缓冲裂解法(PB):取 50 mL 诱导菌液,8 000 r/min 离心 8 min,弃上清;菌体沉淀通过涡旋震荡彻底重悬于含有 1.5 mg/mL 溶菌酶的 1 mL DEPC ddH₂O 中,37 $^{\circ}$ C 处理 1 h。重悬液中加入 60 $^{\circ}$ C 预热的 1 mL 裂解液(0.5% SDS,2 mol/L NaCl,0.2 mol/L K₂HPO₄、NaH₂PO₄ pH 7.4)中,颠倒混匀。超声裂解 5 min(超声 3 s,间隔 5 s)。4 $^{\circ}$ C,8 000 r/min 离心 5 min,吸上清于新的无酶 EP 管中。上清加入等体积异丙醇,颠倒均匀,−20 $^{\circ}$ C 沉淀 3 h。4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min 离心 20 min。沉淀加入 1:1(V/V) 75% 乙醇,4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min 离心 5 min,重复 2 次。沉淀风干 15 min 后,加入 DEPC ddH₂O 溶解 RNA,冰上静置 5~10 min,12 000 r/min 离心 5 min,上清即为 RNA 溶液。−80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.5 dsRNA 表达水平测定及数据统计

测定浓度后以 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 dsRNA 表达情况,用 ImageJ 进行灰度分析比较目的基因表达水平。

1.2.6 dsRNA 对水稻纹枯病温室防效试验

离体试验:在培养皿底部铺上经 ddH₂O 湿润的滤纸片用于叶片保湿,选取 4 周左右长势一致的水稻叶片平铺于滤纸片上。将新培养的纹枯菌菌饼接种至叶片中心位置。各处理滴加 20 μL 溶液于叶片中心位置,置于 28 ℃ 培养箱培养 24 h,观察叶片形态并利用 Photoshop 对病斑面积进行统计分析。

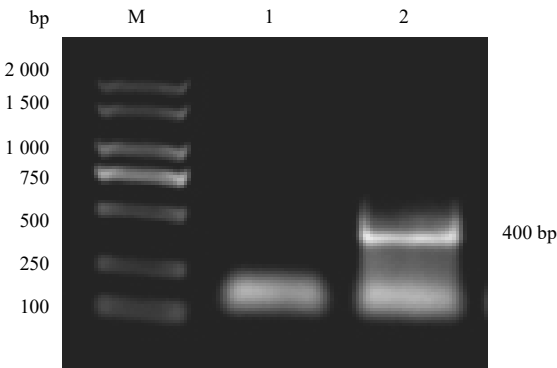
活体试验:选取 4 周左右长势一致的水稻,喷施各处理溶液,为确保每片叶片均能保持挂水状态,每盆使用 10 mL 的喷雾量进行均匀喷洒。药后 3 d,将新培养的纹枯菌菌饼接种至水稻茎秆基部同一位置,接种处理 4~5 d,观察水稻发病情况,并利用 Photoshop 对病斑面积进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 pET28a-RsDCL1/2 重组质粒构建及 dsRsDCL1/2 表达

在重组质粒内部,2 条互补链通过自我折叠构建出 1 个更加稳定的 RNA 发夹结构。鉴于 LOOP 片段为无义内含子,目标 dsRNA 片段大小约为 400 bp。将该重组质粒 pET28a-RsDCL1/2 导入大肠杆菌 DH5α 扩培后,再转化至大肠杆菌 HT115(DE3)中,并通过 IPTG 诱导 dsRNA 表达,诱导表达条带与预期目的片

段大小相符合(图 1)。

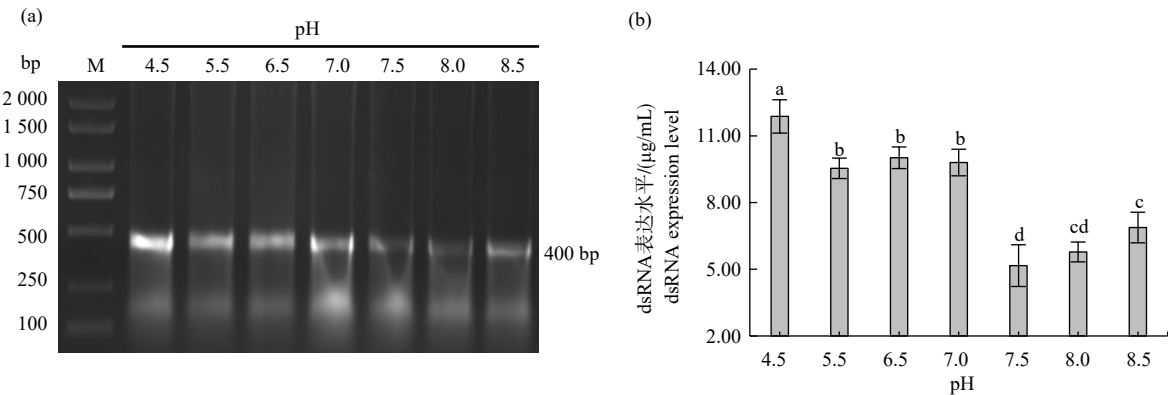


1, pET28a-RsDCL1/2 未经 IPTG 诱导产物; 2, pET28a-RsDCL1/2 经 IPTG 诱导产物。M, 分子标记 DL2000。下同。
1, pET28a-RsDCL1/2 was not induced by IPTG; 2, pET28a-RsDCL1/2 was induced by IPTG. M, 分子标记 DL2000. The same below.

图 1 dsRsDCL1/2 诱导表达图
Fig. 1 dsRsDCL1/2 induced expression map

2.2 pH 对 dsRNA 表达水平的影响

由图 2 可知,在 pH 4.5~8.5 处理中,随着 pH 的增加 dsRNA 的表达水平呈下降趋势,pH 5.5、6.5、7.0 处理的 dsRNA 表达量无显著差异。pH<5.5 时,dsRNA 表达水平则有所提高。pH=4.5 时,条带最宽亮度最大,统计结果也验证了 pH=4.5 时 dsRNA 表达水平最高。尽管酸性环境有利于 dsRNA 的表达,但实际生产中发酵体系初始是 7.0 左右,若添加酸碱试剂调节 pH,不够简便经济,因此,最终确定培养基初始 pH 7.0 进行后续试验。



不同字母表示组间差异显著, $P < 0.05$ 。下同。
Different letters indicate statistically significant differences between groups, $P < 0.05$. The same below.

图 2 不同 pH 条件下 dsRsDCL1/2 的电泳结果 (a) 和表达情况 (b)

Fig. 2 Electrophoresis map (a) and expression level (b) of dsRsDCL1/2 (b) under different pH

2.3 IPTG 诱导浓度对 dsRNA 表达水平的影响

由图 3 可知, dsRNA 表达水平随着 IPTG 诱导浓度的升高而增加, 表明大肠杆菌原核表达系统在 IPTG 的诱导下能够有效启动目的基因的转录与表达。当 IPTG 浓度达到 0.4 mmol/L 时 dsRNA 表达水平达到

峰值, 且表达水平显著高于低浓度组(0.1~0.2 mmol/L)。当 IPTG 浓度进一步提高(≥ 0.6 mmol/L) dsRNA 的表达水平并未呈现显著上升趋势, 说明 0.4 mmol/L 已接近该表达系统的饱和诱导浓度。故确定 IPTG 诱导浓度为 0.4 mmol/L 进行后续试验。

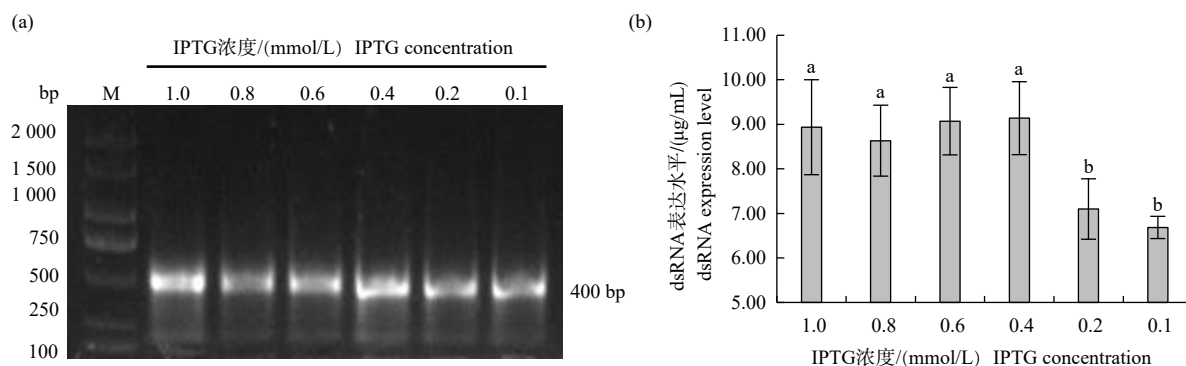


图 3 不同 IPTG 诱导浓度下 dsRsDCL1/2 的电泳结果 (a) 和表达情况 (b)

Fig. 3 Electrophoresis map (a) and expression level (b) of dsRsDCL1/2 under different IPTG induction concentrations

2.4 温度对 dsRNA 表达水平的影响

由图 4 可知, 在试验设定温度范围内, 高温或低温都会影响 dsRNA 的表达, dsRNA 表达水平表现出先升高后降低的趋势。琼脂糖核酸电泳结果显示, 随着诱导温度的升高, 条带的亮度先增强后减

弱, 统计分析表明, 当诱导温度为 25~33 °C 时, dsRNA 表达水平随温度上升而显著增加, 在 33 °C 达到峰值而后逐渐递减; 当温度 > 37 °C 时, 表达水平显著下降, 表明高温对表达系统产生一定负面影响。故确定诱导温度为 33 °C 进行后续试验。

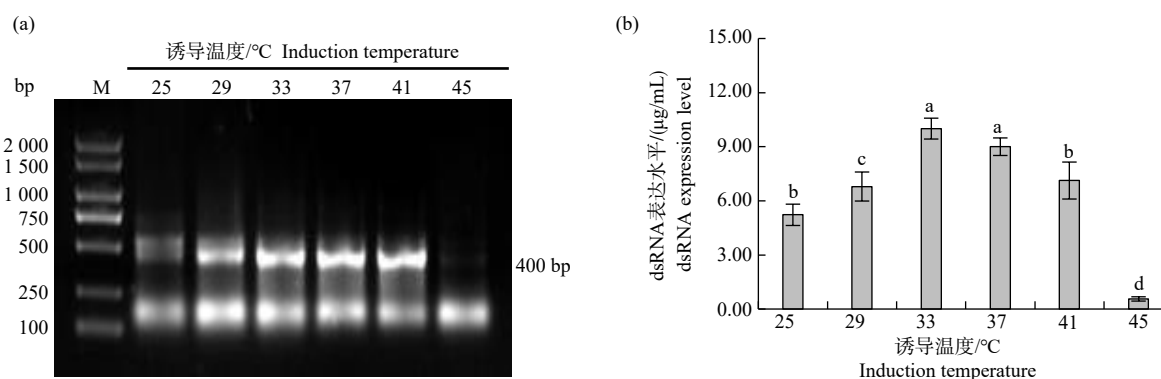


图 4 不同诱导温度下 dsRsDCL1/2 的电泳结果 (a) 和表达情况 (b)

Fig. 4 Electrophoresis map (a) and expression level (b) of dsRsDCL1/2 under different induction temperatures

2.5 转速对 dsRNA 表达水平的影响

由图 5 可知, dsRNA 表达水平随着转速的升高呈现先升高再下降的趋势, 在转速为 160 r/min 时表达水平达到最高, 故确定诱导转速为 160 r/min 进行后续试验。

2.6 诱导时间对 dsRNA 表达水平的影响

由图 6 可知, 随着诱导时间的延长, 条带亮度明

显增强, dsRNA 的表达量呈现出阶梯状的增长趋势。在 2~4 h, 表达水平大约为 5 μg/mL; 当时间延长至 6~10 h, 表达水平增长了 1 倍; 继续延长至 12~16 h, 表达水平在先前的基础上又增加了约 15%。在这个过程中, 12 h 的表达量最高, 故确定诱导时间为 12 h 进行后续试验。

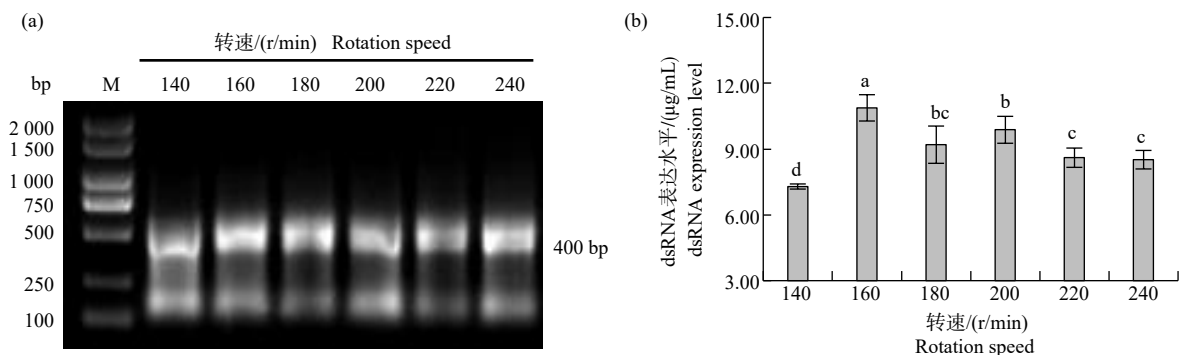


图5 不同转速的 *dsRsDCL1/2* 电泳结果(a)和表达情况(b)

Fig. 5 Electrophoresis map (a) and expression level (b) of *dsRsDCL1/2* under different induction rotation speeds

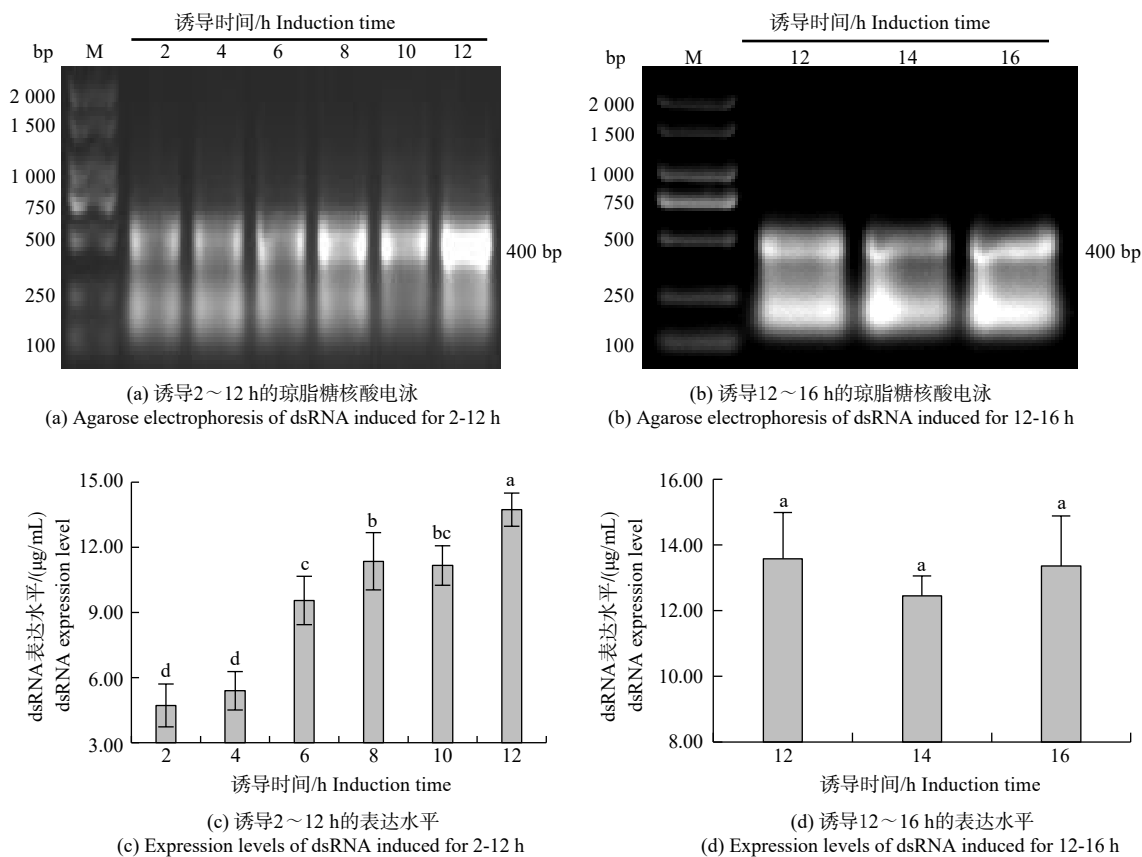


图6 不同诱导时间 *dsRsDCL1/2* 的电泳结果和表达情况

Fig. 6 Electrophoresis map and expression level *dsRsDCL1/2* at different induction time points

2.7 NaCl 浓度对 dsRNA 表达水平的影响

由图7可知, LB培养基中NaCl浓度对dsRNA具有正调控作用, 当LB液体培养基中NaCl浓度在1.25~2.50 g/L时, dsRNA表达水平处于低水平状态; 随着浓度的增加, 当NaCl浓度在5.0 g/L时, dsRNA表达水平达到第1个表达高峰, 较低水平状态提升约3.3倍; 当浓度>5.0 g/L时, dsRNA表达水平再次显著升高,

并在7.5~10.0 g/L表达水平达到稳定平台期, 较5.0 g/L处理组表达水平又提升约1.3倍。故最终选用NaCl浓度为7.5 g/L进行后续试验。

2.8 扩大验证

通过系统的条件优化试验, 确定最终的发酵方案, 优化前后关键参数发生显著变化。在未优化条件下, 采用LB培养基(初始pH 7.0, NaCl 10 g/L)培养至

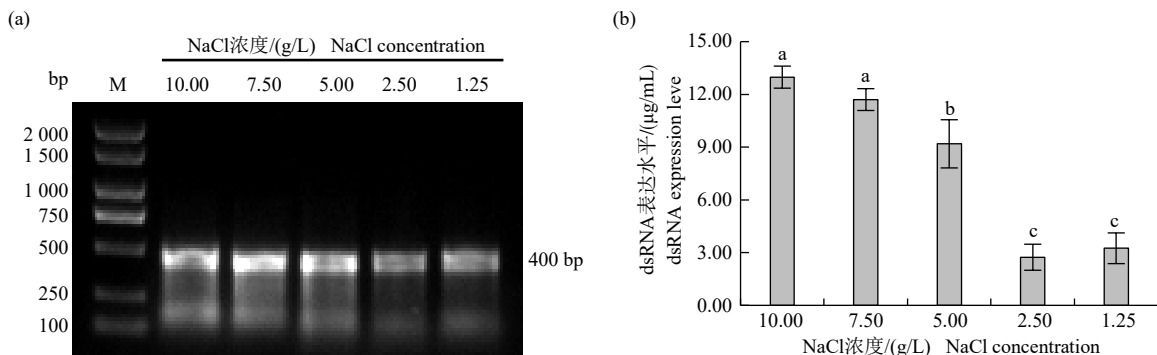


图 7 不同 NaCl 浓度下 *dsRsDCL1/2* 的电泳结果 (a) 和表达情况 (b)

Fig. 7 Electrophoresis map (a) and expression level (b) of *dsRsDCL1/2* under different NaCl concentration

OD₆₀₀=0.6 后,以终浓度 0.6 mmol/L IPTG 在 37 ℃、200 r/min 条件下诱导 6 h;经过多参数优化后,培养条件调整为 LB 培养基(初始 pH 7.0,NaCl 7.5 g/L)培养至相同 OD₆₀₀,随后以 0.4 mmol/L IPTG 在 33 ℃、160 r/min 条件下诱导 12 h,见表 3。

为确保大规模生产提供高效稳定的体系,试验将该方案进行扩大验证。未优化前 500 mL 菌液产 dsRNA 的水平为 9.30±0.69 μg/mL,而经优化后的 dsRNA 表达水平显著升高,是未优化前的 1.32 倍,为 12.28±0.83 μg/mL(图 8)。

表 3 优化前后条件及表达情况对比

Table 3 Comparison of the conditions and expression before and after optimization

优化情况 Condition of optimization	pH	IPTG 诱导浓度/ (mmol/L) IPTG induced concentration	诱导温度/℃ Induction temperature	诱导转速/ (r/min) Induced speed	诱导时间/h Induction time	NaCl 浓度/ (g/L) NaCl concentration	dsRNA 表达水平/ (μg/mL) dsRNA expression level
未优化 Primordial	7.00	0.60	37.00	200.00	6.00	10.00	9.30±0.69
优化后 Optimized	7.00	0.40	33.00	160.00	12.00	7.50	12.28±0.83

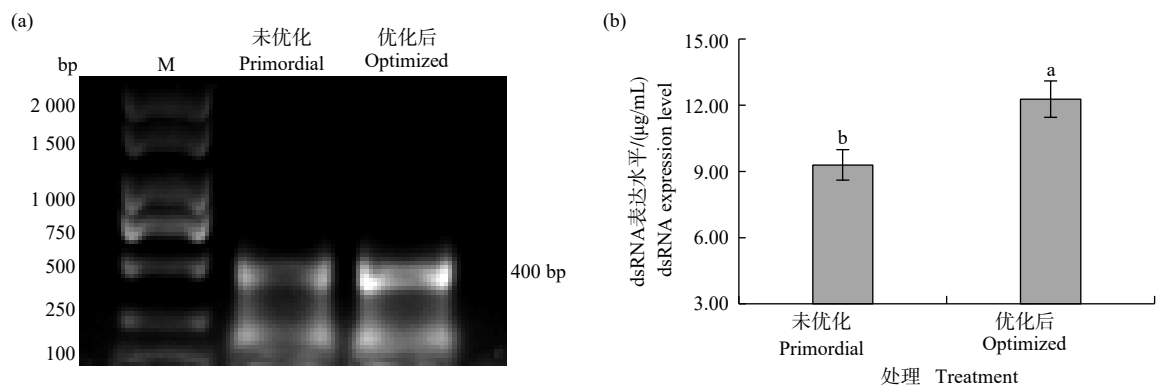


图 8 500 mL 发酵体系中 *dsRsDCL1/2* 的电泳结果 (a) 和表达情况 (b)

Fig. 8 Electrophoresis map (a) and expression level (b) of *dsRsDCL1/2* in 500 mL fermentation system

2.9 dsRNA 提取方法比较

由图 9 和表 4 可知,上述 4 种方法均能得到 *dsRsDCL1/2*,第 4 条泳道的条带最亮,这表明该方

法获取 dsRNA 能力较强。PB 缓冲裂解法的 dsRNA 表达水平最高为 14.44 μg/mL,Trizol 法和 RNA swift 法的 dsRNA 表达水平次之,而 75% 乙

醇固定法的 dsRNA 表达水平最低。PB 缓冲裂解法的 dsRNA 表达水平是 75% 乙醇固定法的 3.89 倍。除此之外,除了 RNA swift 法之外,Trizol 法、75% 乙醇固定法和 PB 缓冲裂解法提取方法得到的 RNA 纯度均较高,稳定性也很好, A_{260}/A_{280} 均处

于 2.0~2.2, A_{260}/A_{230} 保持在 1.8~2.2。而 RNA swift 法的 A_{260}/A_{230} 达到 2.4,远超出上述范围,表明 RNA swift 法提取的 RNA 可能发生了降解。可见,PB 缓冲裂解法提取的 dsRNA 具有较高的表达水平和纯度。

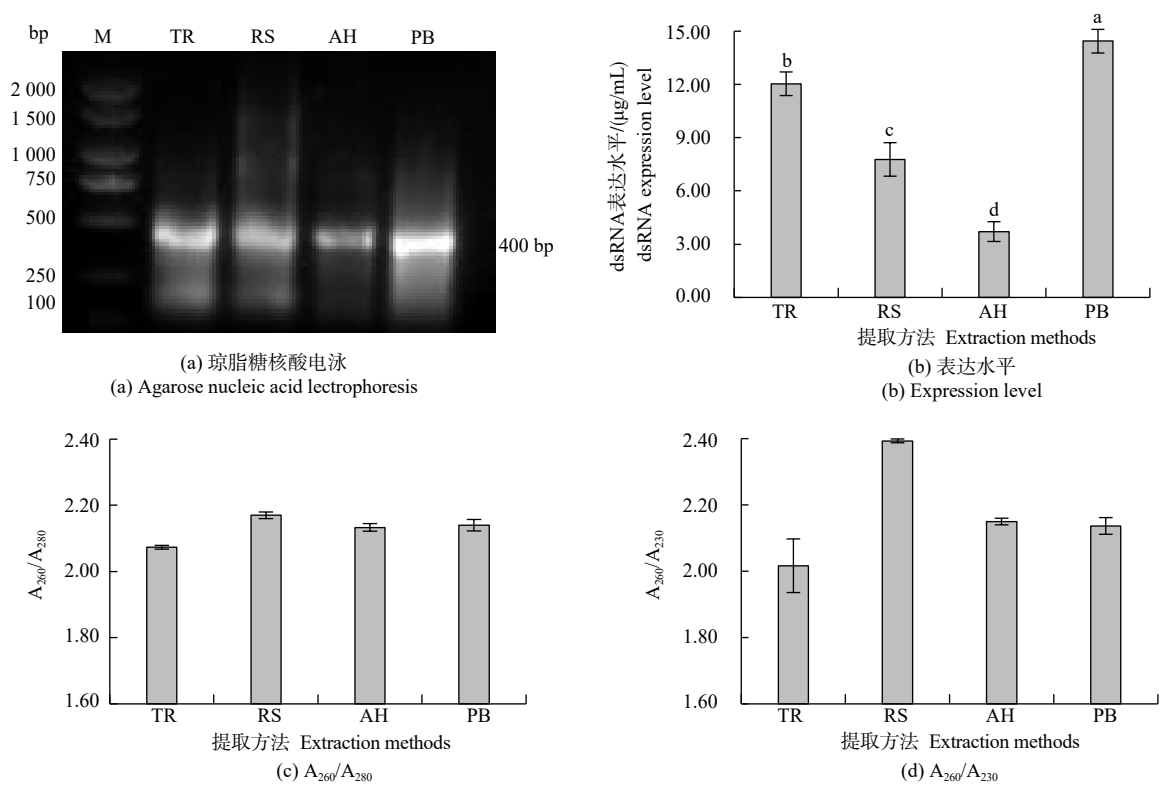


图9 不同提取方法的dsRsDCL1/2的提取效率比较

Fig. 9 Comparison of extraction efficiency of dsRsDCL1/2 under different extraction methods

表4 dsRNA不同提取方法的参数

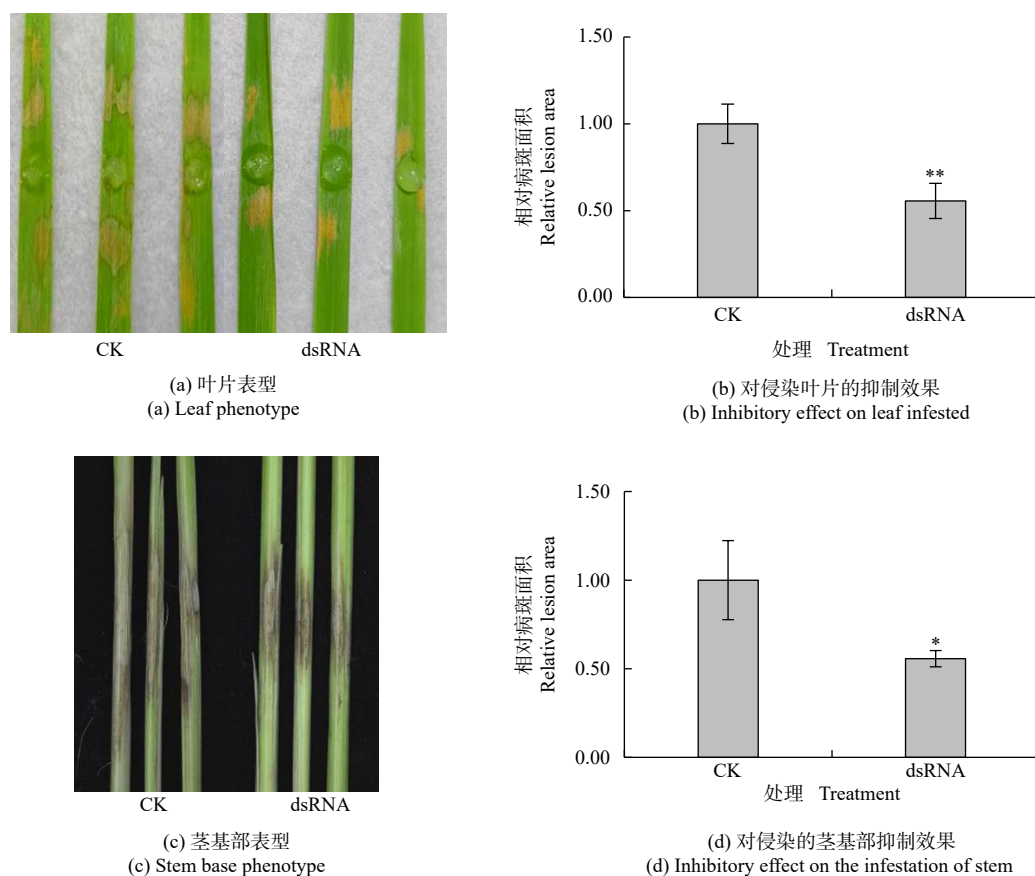
Table 4 Parameters for different extraction methods of dsRNA

方法 Method	dsRNA 表达水平/($\mu\text{g/mL}$) dsRNA expression level	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	用时/h Duration
Trizol	12.04 ± 0.67	2.07 ± 0.01	2.02 ± 0.08	4.22
RNA Swift	7.78 ± 0.94	2.17 ± 0.01	2.39 ± 0.01	4.47
75% 乙醇固定 75% ethanol fixation	3.71 ± 0.56	2.13 ± 0.01	2.15 ± 0.01	4.08
PB 缓冲裂解 PB buffered lysis	14.44 ± 0.67	2.14 ± 0.02	2.14 ± 0.03	5.21

2.10 温室防效试验

由图 10 可知,与对照组(DEPC ddH₂O)相比,喷施 dsRNA 后水稻叶片病斑面积减少 45.22% ($P<0.01$)。此外,dsRNA 处理水稻茎秆基部显著

抑制了病斑的扩展,病斑面积减少 44.33%。可见,采用 PB 缓冲裂解法提取的 dsRNA 可显著降低病斑面积的扩大,有效控制了水稻纹枯病的病情发展。



CK, DEPC ddH₂O; dsRNA, dsRsDCL1/2. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

图 10 dsRNA 对立枯丝核菌侵染的水稻发病的抑制效果

Fig. 10 Inhibitory effect of dsRNA on different parts of rice infested by *Rhizoctonia solani*

3 讨论

RNAi 技术在现代农业生物技术中具有重要功能, 因微生物发酵合成 dsRNA 成本低廉且发酵简便, 大肠杆菌原核表达系统已经成为生产 dsRNA 的有力工具^[10]。优化发酵条件有助于明确细胞的最佳培养条件。本研究 IPTG 浓度优化结果表明, 0.4 mmol/L 为最佳诱导浓度, 这与徐翔等^[33]的研究一致, 但显著低于 Mo 等^[17]当诱导条件为 37 °C、2.0 mmol/L IPTG、时间为 17 h 时 dsRNA 表达量最高所用的 IPTG 浓度, 这可能是因为靶标基因和培养基不同^[34-35]以及其他不同诱导条件相互作用引起的对诱导剂敏感性的差异。在诱导过程中, IPTG 会导致细菌死亡、裂解, 对人体健康也有一定毒害作用^[36-37], 因此, 传统的使用 IPTG 作为诱导大肠杆菌表达系统仍需进一步完善。已有研究表明, 组成型表达的绝缘启动子 proD 与 T7 的协同作用可以实现不添加诱导剂即可提高菌株自身表达 dsRNA 的

能力^[36]; 使用乳糖诱导的 dsRNA 产量相比 IPTG 诱导可提升 10 倍^[35]。此外, 在原核生物表达蛋白的研究中, 建议可用脱脂奶粉代替 IPTG 来诱导蛋白表达^[38], 但在 RNA 生产领域尚未发现类似的研究报道。转速通过影响锥形瓶内含氧量控制菌群生长和影响细菌生长周期, 而处于指数初期的细菌生长量少, 导致大肠杆菌体内 dsRNA 表达量也相对较低, 处于指数后期诱导的 dsRNA 产量和质量均会下降^[39]。长时间的诱导过程可能会引起细菌细胞的自溶, 并且会减少 dsRNA 的稳定性^[34]。此外不同的载体也会影响 dsRNA 的表达效率。对于表达 dsRNA 的载体, 一般 pGEM-T、pET28a/22b 这类含有单个 T7 启动子的构建体比 pL4440 等含有双 T7 启动子的构建体往往能获得更好的表达水平^[40]。Ma 等^[24]研究显示, 采用 pET 28a 载体的大肠杆菌表达系统的产量是 L4440 载体的 3 倍。为了解决 RNA 生产中的难题, 还可以考虑更换为 TB 培养基, 并采用分批补料的发酵策略以提高质粒产量,

或通过改造质粒引入多重合成转录终止子以实现提高dsRNA表达水平的目标^[35,41-44]。

本研究4种提取方法均能有效裂解细胞使其释放dsRNA。Trizol法广泛应用于小规模细菌培养中dsRNA的提取,其核心原理是借助苯酚-胍试剂提取^[22]。Figueiredo等^[39]研究指出,基于相同原理的QIAzol试剂在dsRNA提取过程中的成本占比高达85%,同时试剂具有较大的毒性,这使得该类型试剂并不适合于大规模生产。虽然采用75%乙醇固定法能够得到dsRNA,但其表达水平并不高。这一现象与Ma等^[24]的结论相吻合,而Mo等^[17]研究报道的摇培表达量可达 $(17.90 \pm 4.20) \mu\text{g/mL}$ 。本试验中RNAswift法提取的dsRNA质量波动较大,出现部分降解的现象。试验在探究PB缓冲裂解法提取dsRNA的过程中,主要依据超声、溶菌酶和SDS,通过破坏细胞壁和细胞膜有效裂解细胞来提高dsRNA获取量^[25,45],其中SDS还能起到抑制核糖核酸酶的作用^[46]。同时,高盐浓度($\geq 0.5 \text{ mol/L NaCl}$)下RNase A会特异性切割单链RNA(ssRNA)^[17]。但高浓度的NaCl会导致SDS-蛋白质复合物沉淀生成,RNA纯度受影响,可通过二次离心或添加有机物溶解加以解决^[25]。

本研究通过单因素试验初步解析了各诱导条件对dsRNA产量的影响规律。然而,考虑到多因素交互作用在发酵过程中的重要性,后续还可采用正交试验设计等方法进行更深入的系统优化。

4 结 论

本研究采用大肠杆菌原核表达系统,以pET28a作为载体,以RsDCL1/2为研究目标,构建了pET28a-RsDCL1/2发夹结构载体。通过筛选,确定了最佳的发酵条件为pH 7.0、IPTG诱导浓度 0.4 mmol/L 、诱导温度 33°C 、诱导转速 160 r/min 、诱导时间 12 h 、LB中的NaCl浓度为 7.5 g/L ,表达水平较优化前提升1.32倍。4种提取方法中,PB缓冲裂解法提取dsRNA效果最好,所获得的dsRNA纯度好、表达水平高,其dsRNA表达水平是75%乙醇固定法的3.89倍。温室防效试验结果表明,采用PB缓冲裂解法提取的dsRNA喷施水稻可显著降低病斑面积,充分验证了dsRNA作为生物农药在水稻纹枯病防治中的巨大潜力。

参考文献 References

- [1] Cagliari D, Dias N P, Galdeano D M, Dos Santos E Á, Smaghe G, Zotti M J. Management of pest insects and plant diseases by non-transformative RNAi[J/OL]. *Frontiers in Plant Science*, (2019-10-25). DOI: 10.3389/fpls.2019.01319
- [2] 关梅, 臧子健, 闫硕, 沈杰. RNA农药的研究现状和发展前景[J]. *现代农药*, 2023, 22(2): 11-18
Guan M, Chao Z J, Yan S, Shen J. Research status and development prospects of RNA pesticide[J]. *Modern Agrochemicals*, 2023, 22(2): 11-18 (in Chinese)
- [3] Hoang B T L, Fletcher S J, Brosnan C A, Ghodke A B, Manzie N, Mitter N. RNAi as a foliar spray: efficiency and challenges to field applications[J/OL]. *International Journal of Molecular Sciences*, (2022-06-14). DOI: 10.3390/ijms23126639
- [4] Liu Q P, Feng Y, Zhu Z J. Dicer-like (DCL) proteins in plants[J]. *Functional Integrative Genomics*, 2009, 9(3): 277-286
- [5] Weiberg A, Wang M, Lin F M, Zhao H W, Zhang Z H, Kaloshian I, Huang H D, Jin H. Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathway[J/OL]. *Science*, (2013-10-04). DOI: 10.1126/science.1239705
- [6] Wang M, Weiberg A, Lin F M, Thomma B P H J, Huang H D, Jin H L. Bidirectional cross-Kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection[J/OL]. *Nature Plants*, (2016-09-19). DOI: 10.1038/nplants.2016.151
- [7] Koch A, Biedenkopf D, Furch A, Weber L, Rossbach O, Abdellatif E, Linicus L, Johannsmeier J, Jelonek L, Goesmann A, Cardoza V, McMillan J, Mentzel T, Kogel K H. 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/OL]. *PLoS Pathogens*, (2016-10-13). DOI: 10.1371/journal.ppat.1005901
- [8] Haile Z M, Gebremichael D E, Capriotti L, Molesini B, Negrini F, Collina M, Sabbadini S, Mezzetti B, Baraldi E. Double-stranded RNA targeting dicer-like genes compromises the pathogenicity of *Plasmopara viticola* on grapevine[J/OL]. *Frontiers in Plant Science*, (2021-05-18). DOI: 10.3389/fpls.2021.667539
- [9] Sarkar A, Roy-Barman S. Spray-induced silencing of pathogenicity gene *MoDES1* via exogenous double-stranded RNA can confer partial resistance against fungal blast in rice[J/OL]. *Frontiers in Plant Science*, (2021-11-26). DOI: 10.3389/fpls.2021.733129
- [10] Hough J, Howard J D, Brown S, Portwood D E, Kilby P M, Dickman M J. Strategies for the production of dsRNA biocontrols as alternatives to chemical pesticides[J/OL]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, (2022-10-10). DOI: 10.3389/fbioe.2022.980592
- [11] 高沥文, 陈世国, 张裕, 强胜. 基于RNA干扰的生物农药的发展现状与展望[J]. *中国生物防治学报*, 2022, 38(3): 700-715
Gao L W, Chen S G, Zhang Y, Qiang S. The development of biological pesticides based on RNA interference[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2022, 38(3): 700-715 (in Chinese)
- [12] Saksmerprome V, Charoonnart P, Gangnonngiw W, Withyachumnarnkul B. A novel and inexpensive application of RNAi technology to protect shrimp from viral disease[J]. *Journal of Virological Methods*, 2009, 162(1-2): 213-217
- [13] 关若冰, 李海超, 苗雪霞. RNA生物农药的商业化现状及存在问题[J]. *中国农业科学*, 2022, 55(15): 2949-2960

- Guan R B, Li H C, Miao X X. Commercialization status and existing problems of RNA biopesticides[J]. *Scientia Agricultura Sinica* 2022, 55 (15): 2949-2960 (in Chinese)
- [14] He L, Huang Y N, Tang X M. RNAi-based pest control: Production, application and the fate of dsRNA[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, (2022-11-29). DOI: 10.3389/fbioe.2022.1080576
- [15] Das P R, Sherif S M. Application of exogenous dsRNAs-induced RNAi in agriculture: Challenges and triumphs [J/OL]. *Frontiers in Plant Science*, (2020-06-25). DOI: 10.3389/fpls.2020.00946
- [16] Guan R B, Chu D D, Han X Y, Miao X X, Li H C. Advances in the development of microbial double-stranded RNA production systems for application of RNA interference in agricultural pest control[J/OL]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, (2021-09-13). DOI: 10.3389/fbioe.2021.753790
- [17] Mo Q, Lv B B, Sun Y, Wu X, Song L L, Cai R, Tang X M. Screening and production of dsRNA molecules for protecting *Cucumis sativus* against *Cucumber mosaic virus* through foliar application [J]. *Plant Biotechnology Reports*, 2022, 16(4): 409-418
- [18] Nino-Sánchez J, Chen L H, De Souza J T, Mosquera S, Stergiopoulos I. Targeted delivery of gene silencing in fungi using genetically engineered bacteria [J/OL]. *Journal of Fungi*, (2021-02-05). DOI: 10.3390/jof7020125
- [19] Hashiro S, Chikami Y, Kawaguchi H, Krylov A A, Niimi T, Yasueda H. Efficient production of long double-stranded RNAs applicable to agricultural pest control by corynebacterium glutamicum equipped with coliphage T7-expression system[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105 (12): 4987-5000
- [20] 周毓青. 表达双链 RNA 的苏云金芽孢杆菌 HD73 的构建及其对小菜蛾的作用[D]. 福州:福建农林大学, 2020
- Zhou Y Q. Construction of dsRNA-expressing *Bacillus thuringiensis* HD73 and its effect on *Plutella xylostella*[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2020 (in Chinese)
- [21] Niehl A, Soininen M, Poranen M M, Heinlein M. Synthetic biology approach for plant protection using dsRNA[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, 16(9):1679-1687
- [22] 常瑞. 原核表达 dsRNA 提取方法效果评价及稳定性分析[D]. 喀什:喀什大学, 2021
- Chang R. Effect evaluation and stability analysis of extraction methods for prokaryotic expression dsRNA[D]. Kashi: Kashgar University, 2021 (in Chinese)
- [23] Posiri P, Ongvarrasopone C, Panyim S. A simple one-step method for producing dsRNA from *E. coli* to inhibit shrimp virus replication [J]. *Journal of Virological Methods*, 2013, 188(1-2):64-69
- [24] Ma Z Z, Zhou H, Wei Y L, Yan S, Shen J. A novel plasmid-*Escherichia coli* system produces large batch dsRNAs for insect gene silencing [J]. *Pest Management Science*, 2020,76(7):2505-2512
- [25] Nwokeoji A O, Kilby P M, Portwood D E, Dickman M J. RNASwift: A rapid, versatile RNA extraction method free from phenol and chloroform [J]. *Analytical Biochemistry*, 2016,512:36-46
- [26] 孟庆忠, 刘志恒, 王鹤影, 张书绅, 魏松红. 水稻纹枯病研究进展[J]. 沈阳农业大学学报, 2001(5):376-381
- Meng Q Z, Liu Z H, Wang H Y, Zhang S S, Wei S H. Research progress in rice sheath blight [J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2001(5): 376-381(in Chinese)
- [27] 全国农机推广网. 《2025 年全国农作物重大病虫害发生趋势预报》在京发布[EB/OL]. [2025-01-03]. <https://www.natesc.org.cn/news/des?id=b4092141-f6e6-45d8-8d3e-7b3afc80c723&Category>
- National agricultural machinery extension net. 2025 national forecast on occurrence trends of major crop diseases and insect pests released in Beijing [EB/OL]. [2025-01-03]. <https://www.natesc.org.cn/news/des?id=b4092141-f6e6-45d8-8d3e-7b3afc80c723&Category>(in Chinese)
- [28] 徐利剑, 赵维, 曹聪, 王健, 王茜, 王庆贵. 井冈霉素的研究进展[J]. 中国农学通报, 2015, 31(22): 191-198
- Xu L J, Zhao W, Cao C, Wang J, Wang Q, Wang Q G. Research progress of jinggangmycin [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2015, 31(22): 191-198(in Chinese)
- [29] Kumar B. Efficacy of modern combination fungicide molecules against sheath blight of rice[J]. *Indian Phytopathology*, 2020,73(4):725-729
- [30] Senapati M, Tiwari A, Sharma N, Chandra P, Bashyal B M, Ellur R K, Bhowmick P K, Bollinedi H, Vinod K K, Singh A K, Krishnan S G. *Rhizoctonia solani* Kühn pathophysiology: status and prospects of sheath blight disease management in rice [J/OL]. *Frontiers in Plant Science*, (2022-05-03). DOI: 10.3389/fpls.2022.881116
- [31] Zeng J, Zhang Z J, Zhu Q, Jiang Z Y, Zhong G H. Simplification of natural beta-carboline alkaloids to obtain indole derivatives as potent fungicides against rice sheath blight [J/OL]. *Molecules*, (2020-03-02). DOI: 10.3390/molecules25051189
- [32] 兰驰. 跨界 RNA 沉默纹枯病菌 *DCL1/2* 防治水稻纹枯病的功能研究[D]. 南京:南京农业大学, 2022
- Lan C. Function research of cross-Kingdom RNA silencing of *RsDCL1/2* in protection and treatment of rice sheath blight [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2022 (in Chinese)
- [33] 徐翔, 解屹, 宋丽云, 申莉莉, 李莹, 王勇, 刘明宏, 刘东阳, 王小彦, 赵存孝, 王凤龙, 杨金广. 高效靶向降解烟草花叶病毒核酸的 dsRNA 筛选与大量制备[J]. 中国农业科学, 2021, 54(6): 1143-1153
- Xu X, Xie Y, Song L Y, Shen L L, Li Y, Wang Y, Liu M H, Liu D Y, Wang X Y, Zhao C X, Wang F L, Yang J G. Screening and large-scale preparation of dsRNA for highly targeted degradation of tobacco mosaic virus (TMV) nucleic acids [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2021, 54 (6): 1143-1153 (in Chinese)
- [34] 谭红晓. 原核表达发酵 *StPPO* 基因 dsRNA 工艺优化及应用研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2023
- Tan H X. Optimization of dsRNA process and application of prokaryotic expression of fermented *StPPO* gene [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2023 (in Chinese)
- [35] da Rosa J, Viana A J C, Ferreira F R A, Koltun A, Mertz-Henning L M, Marin S R R, Rech E L, Nepomuceno A L. Optimizing dsRNA engineering strategies and production in *E. coli* HT115 (DE3) [J/OL]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, (2024-01-09). DOI: 10.1093/jimb/kuae028
- [36] Delgado-Martin J, Velasco L. An efficient dsRNA constitutive expression system in *Escherichia coli* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(16-17): 6381-6393
- [37] Nwokeoji A O, Nwokeoji E A, Chou T, Togola A. A novel sustainable platform for scaled manufacturing of double-stranded RNA biopesticides [J/OL]. *Bioresources and Bioprocessing*, (2022-10-06). DOI: 10.1186/s40643-022-00596-2
- [38] Khani M H, Bagheri M. Skimmed milk as an alternative for IPTG in induction of recombinant protein expression [J/OL]. *Protein Expression and Purification*, (2020-02-03). DOI:10.1016/j.pep.2020.105593
- [39] Prates L H F, Merlau M, Rühl-Teichner J, Schetelig M F, Häcker I. An optimized/scale up-ready protocol for extraction of bacterially produced

- dsRNA at good yield and low costs [J/OL]. *International Journal of Molecular Sciences*, (2023-05-25). DOI:10.3390/ijms24119266
- [40] Guan R B, Miao X X, Li H C. Bacteria-based double-stranded RNA production to develop cost-effective RNA interference application for insect pest management[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2024, 2771: 73-81
- [41] Pancoro A, Taufik I, Wijayana S. Media selection and fed-batch fermentation strategy for dsRNA plasmid production in *Escherichia coli* GT115[J/OL]. *BioRxiv*, (2023-03-08). DOI:10.1101/2023.03.07.531461
- [42] Papić L, Rivas J, Toledo S, Romero J. Double-stranded RNA production and the kinetics of recombinant *Escherichia coli* HT115 in fed-batch culture [J/OL]. *Biotechnology Reports*, (2018-11-10), DOI: 10.1016/j.btre.2018.e00292
- [43] Carnes A E, Hodgson C P, Williams J A. Inducible *Escherichia coli* fermentation for increased plasmid DNA production [J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2006,45(3):155-166
- [44] Ross S J, Owen G R, Hough J, Philips A, Maddelein W, Ray J, Kilby P M, Dickman M J. Optimizing the production of dsRNA biocontrols in microbial systems using multiple transcriptional terminators [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2024, 121(11):3582-3599
- [45] Verdonckt T W, Vanden Broeck J. Methods for the cost-effective production of bacteria-derived double-stranded RNA for in vitro knockdown studies [J/OL]. *Frontiers in Physiology*, (2022-04-13). DOI: 10.3389/fphys.2022.836106
- [46] 陈亚兰,于宁,王敏,付现刚,程四清,黄忠. SDS溶液中核糖核酸酶A的结构及活性研究[J]. 四川大学学报:自然科学版,2005,42(6):1224-1228
Chen Y L, Yu N, Wang M, Fu X G, Cheng S Q, Huang Z. Structure and activity of RNase A in SDS aqueous solution[J]. *Journal of Sichuan University : Natural Science Edition*, 2005, 42 (6) : 1224-1228 (in Chinese)

责任编辑:吕晓梅



第一作者简介: 杨壹,南京农业大学植物保护学院硕士研究生。参加国家高层次人才项目1项。获2023年江苏省研究生乡村振兴案例大赛金奖。



通讯作者简介: 牛冬冬,南京农业大学植物保护学院教授,博士生导师。长期围绕小RNA调控机制及RNA生物农药创制、有益微生物与寄主的互作调控机制及病害绿色防控开展研究,在*Nature Communications*、*Plant Biotechnology Journal*、*Current Opinion in Biotechnology*、*Plant Physiology*等期刊发表论文30余篇,4篇论文入选ESI高被引论文,2篇论文入选热点论文。入选国家高层次青年人才计划,主持江苏省杰出青年基金委、国家自然科学基金面上基金等项目。担任全国农药登记评审委员会委员、《植物保护学报》和《植物病理学报》青年编委。