

生产双链 RNA 工程菌的研究进展

崔锦程, 崔洁, 卞小莹*

山东大学 微生物技术国家重点实验室, 山东 青岛 266237

崔锦程, 崔洁, 卞小莹. 生产双链 RNA 工程菌的研究进展[J]. 生物工程学报, 2025, 41(2): 546-558.

CUI Jincheng, CUI Jie, BIAN Xiaoying. Research progress in the engineering strains for producing double-stranded RNA[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(2): 546-558.

摘要: 保障粮食安全需要新型绿色农药。双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 农药通过外源添加特异性靶向病虫害的 dsRNA 来触发 RNA 干扰, 抑制病原菌或害虫的关键基因表达, 从而实现对特定病虫害的有效控制。双链 RNA 农药是一种环境友好型的农药, 具有较强的特异性和高效的基因沉默能力, 但目前还存在生产成本高等问题。利用工程菌株生产 dsRNA 是一种可行的策略, 然而目前还没有具有经济效益的 dsRNA 生产工程菌株出现。本文综述了利用微生物生产 dsRNA 的研究进展和生产策略, 为 dsRNA 生产提供了参考。

关键词: RNA 干扰; 双链 RNA; 工程菌株; 底盘

Research progress in the engineering strains for producing double-stranded RNA

CUI Jincheng, CUI Jie, BIAN Xiaoying*

State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Qingdao 266237, Shandong, China

Abstract: Ensuring food security requires new green pesticides. Double-stranded RNA (dsRNA) pesticides trigger RNA interference by exogenous dsRNA specifically targeting pests and diseases. They can inhibit the expression of key genes in pathogens or pests, thereby achieving effective control of specific pests and diseases. DsRNA pesticides are environmentally friendly, with strong specificity and efficient gene silencing ability, while they have problems such as high production costs. Using engineering strains to produce dsRNA is a feasible strategy, whereas currently there is no cost-effective engineering strain for producing dsRNA. This article reviews the research progress and production strategies of using microorganisms to produce dsRNA, hoping to provide

资助项目: 山东省重点研发计划(2022CXGC020709)

This work was supported by the Shandong Provincial Key Research and Development Program (2022CXGC020709).

*Corresponding author. E-mail: bianxiaoying@sdu.edu.cn

Received: 2024-07-13; Accepted: 2024-10-10; Published online: 2024-10-11

reference for dsRNA production.

Keywords: RNA interference; dsRNA; engineering strain; chassis

农业是百业之基，粮食是立足之本，粮食安全是人类生存和发展的首要问题。在未来几十年里，随着全球人口的持续增长，对农产品的需求将不断上升。病虫害是影响作物产量和品质的重要因素，据调查，全球每年因病虫害导致的作物产量损失在 20%–40% 之间，使用化学农药可以挽回至少 30% 的产量损失^[1]。但化学农药的过度使用造成病害防治效果下降、农药残留超标以及食品安全等问题，给作物生产带来了极大挑战。随着社会的不断进步，人们对健康和环保的关注逐渐增加，因此研发绿色环保的新型农药已成为未来农药领域发展的主要趋势。

双链 RNA 农药可以通过外源施加靶向特定病原菌或害虫特定基因的 dsRNA 来启动 RNAi 反应，从而抑制病原菌或害虫，实现对特定病虫害的控制；相对于化学农药，双链 RNA 农药具有诸多优势；首先，dsRNA 具有较强的特异性和高效的基因沉默能力且不涉及转基因技术；其次，根据靶点的设计，dsRNA 可抑制病毒、细菌和真菌的生长从而对其引起的病害起到防治效果；另外，dsRNA 能够穿越细胞膜，在体内实现长距离传递；最后，dsRNA 在环境中容易降解，是一种环境友好型的农药。基于上述优点，双链 RNA 农药有望成为化学农药的重要补充或替代品^[2]。

双链 RNA 农药利用的是 RNA 干扰技术 (RNA interference, RNAi)，RNAi 是一种广泛存在于真核生物当中的同源定向转录后调控系统，该系统依赖序列互补配对原则特异性地降解 mRNA。1990 年 Fire 和 Mello 发现了 RNA 干扰技术，并于 2006 年获得诺贝尔生理或医学奖，目前该技术已被广泛应用于基因功能研究、

基因治疗等多个领域^[3]。如图 1 所示，RNAi 的关键组成部分之一是 dsRNA，dsRNA 进入细胞后，首先被细胞中 III 型核糖核酸酶 Dicer 2 切割为 19–23 bp 的小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)，其两端分别带有 2 bp 的黏性末端。siRNA 中热稳定性较差的一条链与 Argonaute (AGO)、Hsp70/Hsp90、Dicer 等蛋白质结合，装配成 RISC (RNA induced silencing complex) 复合体，该复合体中的 AGO 蛋白具有 4 个结构域，N-末端结构域负责解开双链并装载引导链以组装成熟的 RISC，PAZ 结构域特异性识别 ssRNA 的 3' 端，MID 结构域结合 5' 端，一些 AGO 中的 PIWI 结构域具有切割功能，该复合体可通过切割或抑制 mRNA 翻译来下调基因的表达^[4-5]，在 mRNA 切割过程中产生的核糖核苷酸小片段可以继续与 AGO 等蛋白结合持续触发 RNAi 效应。此外，microRNA、short hairpin RNA 等小 RNA 也可以触发 RNAi，但将 RNAi 应用于农业领域时，应用最广泛的是外源添加 dsRNA。

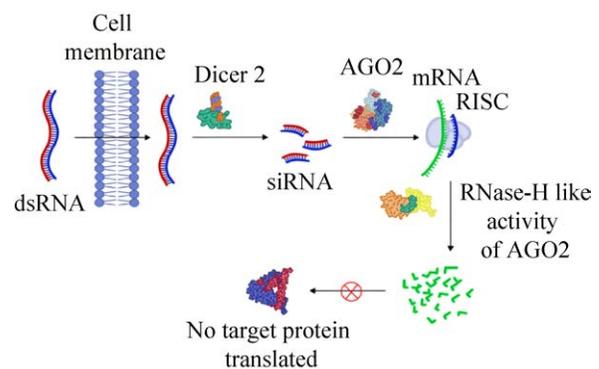


图 1 RNAi 原理示意图

Figure 1 Schematic diagram of RNAi principle.

目前主要有 2 种应用 dsRNA 防治植物病虫害的方法，一种是培育转基因植株，使其表

达靶向害虫必需基因的 dsRNA。2017 年, 拜耳集团研发的含有玉米根虫防控性状的玉米种子(Smartstax[®] PRO MON87411)获得了多个国家的安全证书及种植许可, 该作物在表达 Cry34Ab1/Cry35Ab1 和 Cry3Bb1 两种苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)蛋白的基础上可表达靶向玉米根虫的 dsRNA, 可增强对玉米根虫的控制^[6-7]。2021 年, 科迪华农业科技公司利用转基因方法获得了玉米转化体 DP23211, 能同时表达 DvSSJ1 dsRNA 和 IPD072Aa 蛋白, 可对玉米根虫进行有效防治^[6-7]。另一种是利用载体递送或直接喷洒 dsRNA 以触发 RNAi 效应^[8]。这种方法无须构建转基因植株, 不具有遗传性, 其本质是通过外源添加 RNAi 途径的底物 dsRNA, 来特异性地抑制害虫或病毒必需基因的表达, 但该方法的实施需要以廉价的方式生产足量的 dsRNA。2019 年, 拜耳集团向美国环境保护署(U.S environmental protection agency, EPA)提交了第一份外源应用的 RNA 生物农药——BioDirect, 该产品是利用 RNAi 原理, 通过外源添加 dsRNA 进行瓦螨的防治; 2023 年底 Greenlight Biosciences 开发的以双链 RNA 为有效成分的农药 Calantha[™] 被美国 EPA 批准, 用于防治科罗拉多马铃薯甲虫^[6-7]。

目前用于生产 dsRNA 的方法主要有 3 种: 第一种是化学合成法, 利用核糖核苷酸(nucleoside triphosphate, NTPs)合成 2 条互补的单链 RNA (single stranded RNA, ssRNA), 使互补的单链 RNA 退火形成 dsRNA。目前合成 dsRNA 的工业成本已低至 60 美元/g, 但受限于合成技术, 所得到的 dsRNA 产品长度较短^[9]。第二种方法是体外转录(*in vitro* transcription, IVT), 通过 RNA 聚合酶进行体外合成^[10], 是实验室范围内合成 dsRNA 的常规方法, 大多数 IVT 反应使用噬菌体 T7 DNA 依赖性 RNA 聚合酶(DNA dependent

RNA polymerase, DdRp)^[11], 一次反应可产生 50–100 μg 的 dsRNA。MEGAscript[™] RNAi 试剂盒可以生产 dsRNA, 10 mg 的成本约为 3 000 美元, 其成本仍然较高, 并不适用于大规模应用^[10]。由 GreenLight Biosciences 开发的无细胞表达体系在 dsRNA 生产中有着巨大的优势, 其成本已低至 0.5 美元/g^[12]。第三种是构建优质的微生物细胞工厂用于生产目标 dsRNA, 目前已有多项研究通过发酵来生产 dsRNA, 并通过实验验证了所得的 dsRNA 具备触发 RNAi 的效果, 该方法无需使用酶制剂, 具有一定的成本优势, 有望成为大规模生产 dsRNA 最有效和最具成本效益的方法^[13]。通过理性化设计与改造将自然菌株开发为适于 dsRNA 表达的底盘菌株, 有利于实现较低成本下的 dsRNA 高产。本文主要综述了近期用于生产 dsRNA 的工程菌株和提高 dsRNA 产量的研究进展。

1 用于生产 dsRNA 的底盘菌

构建工程菌株来生产目标产物是常见的策略, 通过基因工程技术, 可以对微生物的代谢途径进行改造, 使其能够更高效地合成目标化合物。同样, 构建工程菌株是实现双链 RNA 农药大规模生产的重要途径。目前已用于 dsRNA 生产的菌株有大肠杆菌、谷氨酸棒杆菌、假单胞菌、芽孢杆菌、酵母以及部分共生菌等, 详见表 1。

1.1 大肠杆菌

大肠杆菌(*Escherichia coli*)是最重要的模式菌之一, 因其遗传信息清晰、遗传操作系统丰富、生长迅速、培养成本低, 已被开发为生产多种产物的工程菌株。目前 HT115(DE3)、JM109(DE3)、BL21(DE3)等菌株已被开发为底盘细胞用于生产 dsRNA^[24]。L4440-HT115(DE3)系统是目前实验室中生产 dsRNA 时使用最广泛的, HT115(DE3)

表 1 目前用于 dsRNA 生产的底盘菌

Table 1 Representative chassis during the production of several dsRNAs

Chassis	Feature	Yield	Advantage	Disadvantage	References
<i>Escherichia coli</i>					
HT115(DE3)	Inactivation of <i>rnc</i> , <i>rnd</i> and <i>rne</i>	1.30 mg/L (15 mL container)	Mature genetic operating system and fermentation system	Low yield	[14]
BL21(DE3) RNaseIII-	Inactivation of <i>rnc</i>	4.23 mg/L (15 mL container)			[14]
M-JM109 LacY	Inactivation of <i>rnc</i> and <i>lacY</i>	7.28 times of 16S rRNA expression			[15]
<i>Corynebacterium glutamicum</i>					
2256LΔrnc	Inactivation of <i>rnc</i> , Strong promoter F1, U1A protein plays a protective role	300 mg/L (0.3 L fermentor)	Efficient production, mature fermentation system	–	[16]
	Inactivation of <i>rnc</i> , vector pPK4H1 with higher copy number, promoter and terminator of T7 phage	1 000 mg/L (0.3 L fermentor)			[17]
<i>Pseudomonas syringae</i>					
LM2691	The phage of <i>Pseudomonas</i> was modified to produce specific double-stranded RNA while proliferating	7 mg/L	Two dsRNAs can be expressed simultaneously	Low yield	[18]
<i>Bacillus thuringiensis</i>					
4Q7	The sporulation-dependent strong promoter Cyt1Aa with STAB-SD sequence in the expression plasmid	It accounted for 0.1% of total RNA (10 mL container)	Target dsRNA can be produced during sporulation without induction; autolysis without extraction of dsRNA	–	[19]
Symbiotic bacterium					
<i>Snodgrassella alvi</i> ME315	Stable colonization, inactivation of <i>rnc</i> , <i>in situ</i> production of dsRNA	–	Self-proliferation, inter-host transmission, persistence	There are potential ecological risks and the genetic operating system is limited.	[20]
<i>Rhodococcus rhodnii</i> MG5362	Integrate dsRNA expression cassettes into chromosomes	–			[21]
<i>Enterobacteriales</i> BFo2		–			
<i>Saccharomyces</i>					
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> syt.427	Strong constitutive promoter; gPD strong inducible promoter Gal1 and <i>cyc1</i> terminator	–	With no RNAi system; safe and easy to transport; mature fermentation system	May produce the wrong dsRNA, the yield is low	[22]
<i>Yarrowia lipolytica</i> P01-AS	Vector pRRQ1 and promoter XPR2	182 ng/L (1 L container)			[23]

菌株中编码核糖核酸酶 RNase D 和 RNase E 的基因 *rnd* 和 *rne*, 以及编码 dsRNA 特异性核酸内切酶 RNase III 的基因 *rnc* 均被失活, 从而使菌株合成 dsRNA 的能力得到提高^[25]。Palli 团队^[26]利用 HT115(DE3)产生靶向科罗拉多马铃薯甲虫(*Leptinostarsa decemlineata*)的 dsRNA, 在喂食甲虫后成功触发 RNAi 效应导致其显著死亡。Yin 等^[15]在 JM109(DE3)的基础上, 将 *rnc* 与 *lacY* 基因突变, 其中 *lacY* 基因编码 β -半乳糖苷渗透酶, 其缺失可以使细胞受到 IPTG 更均一水平的调节和诱导。Ma 等^[14]将 pET28 载体、L4440 载体与 BL21(DE3)RNase III-、HT115(DE3) 两两组合, 结果显示 pET28-BL21 (DE3)RNase III-产量最高, 可达 4.23 $\mu\text{g/L}$, 是 pET28-HT115(DE3) 的 4.8 倍, 是常用来生产 dsRNA 的 L4440-HT115 (DE3)系统的 3 倍。

1.2 谷氨酸棒杆菌

谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)是生产氨基酸时最常用的菌种之一, 最近的研究发现谷氨酸棒杆菌可以产生大量 RNA^[16]。Hashiro 等^[27]以谷氨酸棒状杆菌为底盘细胞生产 dsRNA, 对生产菌进行酒精或热处理灭活, 使得 dsRNA 在体内稳定存在, 在用含有 *diap1**-dsRNA 的灭活菌体喂食茄二十八星瓢虫(*Henosepilachna vigintioctopunctata*)后, 发现这种预处理后的 dsRNA 仍具有 RNA 干扰的效果, 使得害虫中 *diap1* 的表达受到抑制, 幼虫的食叶活动减弱。2019 年, Hashiro 等^[17]在原有谷氨酸棒状杆菌生产系统的基础上进行了优化, 使用拷贝数约为 300 的 pVC7N 载体以及强启动子 F1, 此外研究人员设计了靶 RNA 模型——U1A*-RNA, 同时引入可与之结合的 U1A 蛋白, 该蛋白的 SL-II 结构区域可与 U1A*-RNA 特异性结合从而起到保护作用, 最终 U1A*-RNA 产量在 24 h 内可达 300 mg/L; 随

后该团队对此生产平台进一步优化, 使用拷贝数约为 800 的 pPK4H1 载体、T7 噬菌体的 RNA 聚合酶及终止子, 所得工程菌株在 0.3 L 发酵罐中 dsRNA 的产量最高可达 1.0 g/L, 发酵结束时 OD_{620} 可达 160, 且结果显示产生的 dsRNA 数量超过了宿主菌内源性 5S rRNAs 的数量, 在不影响生产效率的基础上可以生产长达 1 kb 的 dsRNA, 而使用 F1 启动子时, 仅能产生长度为 500 bp 的 dsRNA。

1.3 丁香假单胞菌

假单胞菌噬菌体($\phi 6$)是一种 dsRNA 病毒, 可以特异性地侵染假单胞菌, 其含有的依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶(RNA dependent RNA polymerase, RdRp), 是 dsRNA 病毒编码合成基因组必需的酶, 可以利用 ssRNA 作为模板合成 dsRNA^[28]。Niehl 等^[18]开发了一种基于噬菌体 $\phi 6$ 及其宿主丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)的 dsRNA 生产方法^[18,29]; 该工作根据 Phi6 噬菌体原基因组特点构建了 3 种质粒, 分别为 pLM991、pMS2-9 rep-MP 和 pLD18-5 rep-MP, 它们分别依赖 T7 启动子转录出经过改造的 $\phi 6$ 噬菌体基因组中的 L 段、M 段、S 段, 其中 L 段会翻译成带有 RdRp 活性的原衣壳, M 段和 S 段经过理性改造后转录出带有靶序列的 ssRNA, 原衣壳包裹 3 种 ssRNA 的同时生成互补链, 此时即生成了一个完整的假单胞菌噬菌体 $\phi 6$, 可以在丁香假单胞菌中不断扩增下去, 而其基因组中的 M 段和 S 段即为目标 dsRNA 产物; 该系统可产生 2 600 bp 以上的 dsRNA, 并且可以同时产生 2 种序列不同的 dsRNA。研究人员利用该系统同时生产了靶向 TMV 病毒复制酶和运动蛋白的 dsRNA, 并在 100 mL 发酵液中提取到 700 μg dsRNA, 经实验验证, 生产的 dsRNA 可以有效地抑制 TMV 病毒在植物中的传播^[18]。该工作巧妙地改造了假单胞噬菌体的基因组, 利用

dsRNA 病毒合成自身基因组的工作酶合成目标 dsRNA, 使 dsRNA 的产生更偏向于生物学过程, 为生物技术和农业病害防控领域提供了创新性的解决方案。

1.4 苏云金芽孢杆菌

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)可以在芽孢形成期间表达具有杀虫活性的 Cry 毒素, 目前已广泛用于防治鳞翅目害虫。Park 等^[19]将苏云金芽孢杆菌改造为 dsRNA 底盘菌, 生产了具有抑制囊状幼虫病毒(sacbrood virus, SBV)活性的 dsRNA, 实验结果表明, 在一定范围内, dsRNA 对囊状幼虫病毒复制的抑制效果与 dsRNA 的饲喂量正相关, 在饲喂 24、48、72 h 后, 虫体内囊状幼虫病毒的复制均得以抑制。该研究巧妙地将 Cry 毒素 mRNA 半衰期比细菌 mRNA 平均半衰期长 5 倍的特点应用于 dsRNA 的生产, 将控制 Cry 毒素表达的产孢依赖性启动子 *cyt1Aa* 置于靶基因 *SBV-VPI* 的两侧, 在产孢阶段无须诱导即可高强度转录下游基因; 细菌生长后期自溶释放 dsRNA, 无须再裂解细胞, 节约诱导剂与裂解细胞所产生的费用及时间成本^[19]。此外, 该研究在 dsRNA 生产质粒中引入了 STAB-SD 序列, 30S rRNA 与该 STAB-SD 序列的结合可以保护 mRNA 免受核糖核酸酶活性的影响, 从而产生稳定的转录产物^[19]。利用苏云金芽孢杆菌产生靶向鳞翅目害虫的 dsRNA, 能与 Cry 毒素形成协同作用, 提升对害虫的防控效率与效果。

1.5 昆虫共生细菌

昆虫共生细菌可以自我增殖并源源不断地产生 dsRNA, 实现双链 RNA 农药的持久作用, 且共生细菌还可以在宿主间进行传播。Leonard 等^[20]改造了蜜蜂肠细菌(*Snodgrassella alvi*), 使其可以稳定地定殖在蜜蜂肠道中并产生 dsRNA, 研究表明产生的 dsRNA 可以触发 RNAi

效应, 提高蜜蜂在病毒和瓦螨攻击后的存活率。Whitten 等^[21]将特异性的 dsRNA 表达盒分别插入到了锥蝽(*Rhodnius prolixus*)和西方花蓟(*Frankliniella occidentalis*)的共生菌罗地红球菌(*Rhodococcus rhodnii*)和肠杆菌(*Enterobacteriales* BFo2)的基因组中, 所产生的 dsRNA 显著降低了宿主的繁殖能力。但使用共生菌表达 dsRNA 来遏制病虫害也伴随着潜在的生态风险, 还需要进行更充分的风险评估和安全性测试。

1.6 酵母

酵母是发酵中常用的安全生产菌株, 具有清晰的遗传背景、丰富的遗传操作系统及完善的发酵工艺, 同时, 酵母中没有 Dicer 2 和 Argonate 2 这 2 种 RNAi 途径中的核心基因, 因此被认为是积累 dsRNA 的潜在细胞工厂, 但也有报道称酵母中 *rnt1* 基因的表达产物具有 dsRNA 切割活性^[30]。Alvarez-Sanchez 等^[23]利用解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)生产 dsRNA 来抑制虾养殖过程中易感染的白斑综合征病毒, 但与其他系统相比该系统产量较低, 仅有 182 ng/L, 该研究验证了 *rnt1* 基因的表达产物的 Dicer 活性, 在 dsRNA-ORF89 前体产生后, 酵母中的 *rnt1* 基因的表达量相应提高; 将解脂耶氏酵母中提取到的总 RNA 通过肌肉注射到虾体内后, 虾受到白斑综合征病毒感染的概率下降 25%。Mysore 等^[31]表明含有特异性 dsRNA 的干燥灭活酿酒酵母制剂与未灭活的酿酒酵母具有相同的活性。

目前被报道的工程菌株通过改造关键基因和表达质粒的调控元件, 与野生型相比均实现了高效产生 dsRNA 的能力。然而随着技术的不断进步, 可能会有更多的菌种被开发用于生产 dsRNA, 更高效的调控元件被发现, 为 dsRNA 的大规模生产提供更多选择并进一步提高产量, 推动其在农业和医药领域的应用。

2 影响 dsRNA 产量的因素

在底盘菌中成功表达 dsRNA 之后通常需进一步提高产量(图 2)。目前影响 dsRNA 产量的因素主要有:dsRNA 表达质粒的构建方式、表达质粒的拷贝数及稳定性、表达质粒中启动子强度及终止子效率、工程菌株的修饰改造、发酵参数及 dsRNA 的提取方法等。

2.1 表达质粒的构建方式

目前构建 dsRNA 表达质粒的方式主要有 2 种:第 1 种是由 2 个不同方向的启动子分别控制同一段靶基因进行转录,转录出的 2 条 ssRNA 相互退火形成双链。研究表明,噬菌体 T7 的 RNA 聚合酶在转录过程中在对立的 DNA 链上相互碰撞时不会受到很大的抑制^[32];第 2 种

策略是将靶基因一正一反置于启动子后,靶基因间中间以 loop 环作间隔,转录出的 ssRNA 分子可以内部退火形成 dsRNA。有研究表明第 2 种策略所得 dsRNA 产量更高^[14]。

2.2 启动子强度和类型

生物元件是用于组装和调控基因表达系统的基本序列,其中启动子的强度直接决定了下游基因的转录水平,使用更强的启动子是提高 dsRNA 产量的策略之一。崔洁等^[33]将来源于本源菌的不同启动子后插入 *GFP* 基因来表征启动子的强度,发现同一启动子在不同生长时期的强度是不同的,所以根据底盘菌生产 dsRNA 的时期及生产需要选择适宜的启动子是必要的。有研究表明,启动子的强度还与其近端 DNA 序列的二级结构有关,这对转录活性具有较大的影响^[34]。

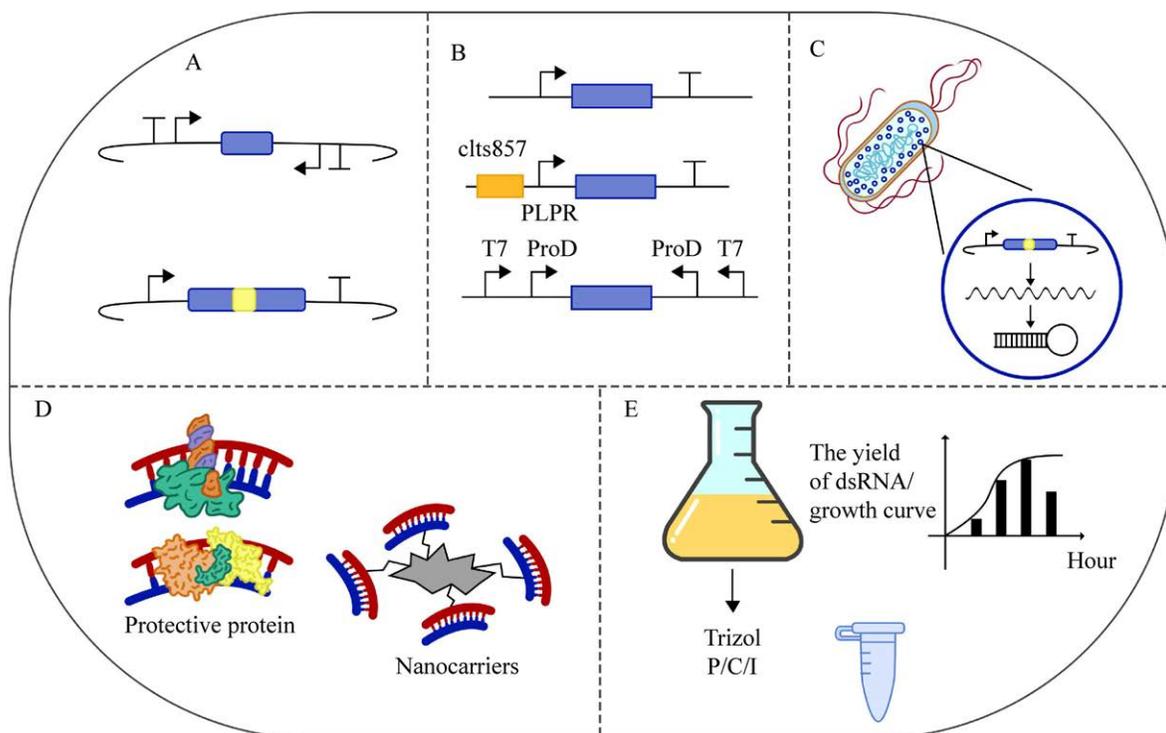


图 2 影响 dsRNA 产量的主要因素 A: 表达质粒构建方式。B: 组成/诱导型启动子、启动子串联。C: 质粒拷贝数。D: 保护蛋白、纳米载体。E: 发酵及提取工艺。

Figure 2 Key factors affecting dsRNA production. A: Construction method of expression plasmid. B: Constitutive/inducible promoter, tandem promoter. C: Plasmid copy number. D: Protective protein, nanocarrier. E: Fermentation and extraction process.

目前在大肠杆菌及谷氨酸棒杆菌中使用较多的是噬菌体 T7 来源的 T7 启动子,其需要使用较为昂贵的诱导剂 IPTG 来进行诱导。ProD 启动子是一种合成的组成型启动子,Delgado-Martín 等^[35]将 T7 启动子和 ProD 启动子串联构建了一种大肠杆菌中高效表达 dsRNA 的组成型生产系统,该组成型表达系统无需使用诱导剂,在节约生产成本的同时,实现了比 T7 启动子诱导型生产系统高 2 倍的 dsRNA 产量;此外,该研究还发现 D-乳糖可作为诱导剂使用,且诱导效率高于 IPTG,可以提高 dsRNA 的合成效率。有报道称大肠杆菌中可以使用温控表达质粒 PBV220 实现 dsRNA 的温度诱导表达,在 42 °C 下 PBV220 质粒中的 PLPR 启动子会高效启动下游基因转录,达到节省成本的目的^[36]。最近 Liu 等^[37]开发了一种基于大肠杆菌的光/暗诱导高效表达系统,避免了 IPTG 对菌体潜在毒性及诱导不可逆等缺点。Baum 等^[38]表明使用更高效的终止子或串联 2 个 T7 终止子也会提高 dsRNA 的产量。

2.3 质粒拷贝数

增加 dsRNA 表达质粒的拷贝数是提高 dsRNA 产量的策略之一。在 Hashiro 等^[17]对谷氨酸棒杆菌的研究中,只改动载体部分,将拷贝数约为 300 的质粒更换为拷贝数约为 800 的质粒,dsRNA 产量由 75 mg/L 提高到了 150 mg/L;该研究同时说明 dsRNA 生产质粒在谷氨酸棒杆菌内是不够稳定的,其质粒保留率小于 20%,替换更高效的终止子或引入质粒分配系统(如 *par* 基因)有利于提高质粒稳定性,从而进一步提高 dsRNA 的积累^[17]。*EndA* 基因表达非特异性核酸内切酶 I,该基因的缺失可以使外源 DNA 更加稳定。*RecA* 基因表达 ATP 依赖型 DNA 重组酶,其缺失会有效抑制或阻断同源及异源 DNA 之间的重组过程,保证插入 DNA 的稳定

性;另外有研究人员通过失活 *endA* 和 *recA* 基因,使得菌株中外源质粒和 dsRNA 的稳定性得到提升^[2,15]。

2.4 dsRNA 结合蛋白/纳米载体

2.4.1 dsRNA 结合蛋白

与 dsDNA 典型的 B 型螺旋不同,dsRNA 通常为 A 型螺旋,与蛋白质的结合并非直接依赖于特定的碱基序列,而是主要由糖-磷酸骨架介导^[39]。RNA 沉默病毒抑制子(viral suppressors of RNA silencing, VSR)指病毒编码的一类能够抑制宿主细胞中 RNAi 效应的一类蛋白质;有报道称小麦花叶病毒(*Triticum mosaic virus*, TriMV)编码的 TriMV P1 蛋白和本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)编码的 DRB2 蛋白等 RNA 沉默病毒抑制子可与 dsRNA 结合,并使其免受核酸酶降解^[40-41]。Gupta 等^[41]研究表明, TriMV P1 蛋白在 dsRNA 受到体外切割时可以显著减少切割产物的积累;当 TriMV P1 蛋白的 GW 基序受到破坏时会丧失抑制 RNAi 的活性,但并不影响结合 dsRNA。Hashiro 等^[16]设计了靶 RNA 模型——U1A*-RNA,同时引入可与之结合的 U1A 蛋白,该蛋白的 SL-II 结构区域可与 U1A*-RNA 特异性结合从而起到保护作用。此外,人类体内存在与免疫相关的 dsRNA 结合蛋白 NLRP1、RIG-I、MDA5 等;NLRP1 可以特异性地结合长的 dsRNA^[42];RIG-I、MDA5 是细胞内主要的 dsRNA 病毒感受器,前者主要监控 dsRNA 5'端的三磷酸基团,后者主要依赖双链长度识别 dsRNA^[43];在利用 IVT 生产 mRNA 时,有时会使用 J2 抗体特异性检测副产物 dsRNA,但该方法无法区分具有二级结构的 ssRNA 和 dsRNA^[44]。在 dsRNA 的生产质粒上同步表达一些 dsRNA 结合蛋白,防止其被降解也是一种提高 dsRNA 产量的策略,但目前尚未见相关报道,此外这种通过结合蛋白实现的保

护是否会影响 RNAi 的效率还需进一步的实验证明。

2.4.2 纳米载体

纳米载体在 dsRNA 喷施到吸收这一过程中起到减少 dsRNA 降解甚至促进其吸收的生物材料。Ma 等^[45]开发了一种星状阳离子聚合物纳米载体, 该研究阐释了纳米载体从结合 dsRNA 到促进其发挥作用的全过程, 其可以通过静电吸引、氢键、范德华力作用与 dsRNA 稳定结合, 显著延长了其在环境中及在昆虫体内的半衰期, 通过转录组分析, 该纳米载体可以激活网格蛋白介导的内吞作用从而实现昆虫体壁的高效递送, 成功克服了 RNA 农药持效期短、植物源农药速效性差的问题。研究表明, 苦参碱/星形聚阳离子/dsRNA 具有速效性, 施药后 3 d 防效可达 77.22%, 施药后 7 d 的防效可达 90.09%^[46]。

2.5 发酵时间

生长时期对于微生物发酵生产 dsRNA 的产量也有较大影响。Park 等^[19]在使用苏云金芽孢杆菌底盘菌发酵生产 dsRNA 的过程中发现, 随着发酵时间的延长 dsRNA 产量呈现出先升高后降低的趋势, 其中培养 18 h 时 dsRNA 最高。Hashiro 等^[16]的研究结果表明, 谷氨酸棒杆菌在培养至即将进入稳定期时可获得最高 dsRNA 产量, 培养至稳定期后期的菌株 dsRNA 产量仅有最高的 1/3; 在敲除了 RNase III 的情况下, 菌株生长至稳定期后期时 dsRNA 的产量明显低于菌株刚进入稳定期的产量, 这表明 dsRNA 被其他在稳定期表达的酶降解或由于细胞中的某种条件而降解的。有研究表明菌体量也是 dsRNA 产量提高的关键因素^[47]。在这种情况下, 需要找到一个平衡点, 既要保证生物量大, 又要保证这个时期的 dsRNA 积累量最大。此外, 诱导剂添加量与诱导时间被证明同

样重要, 计慧君等^[48]的研究结果表明当 IPTG 的工作浓度为 0.1 mmol/L 或 0.5 mmol/L 时, dsRNA 的产量没有明显变化, 当工作浓度增加至 1 mmol/L 时, dsRNA 产量会明显减少, 且在 2–8 h 的诱导时间内, 诱导 6 h 时产量最佳。

2.6 dsRNA 定量方法

检测工程菌中 dsRNA 产量通常需要快速的 dsRNA 提取和定量方法。目前常用于提取 dsRNA 的方法有 70%乙醇提取法、Trizol 法、酚氯仿法(P/C/I 法)^[49], 均是先提取总 RNA, 再使用 RNase A 及 DNase I 进行消化处理, 以消除 ssRNA 及残留 dsDNA。Ma 等^[14]在使用 70%乙醇提取后使用 MEGAclear™试剂盒进行了纯化, 再使用 NanoDrop 2000 进行定量。近期有研究发现^[50]使用酚氯仿法提取 dsRNA 可获得与 Trizol 法相当的产量, 同时具有更低的成本优势, 在使用酚氯仿法提取前后进行酸化处理, 可以显著减少杂质的存在, 从而提高 dsRNA 的纯度^[48]。计慧君等^[48]的研究表明, 在使用 Trizol 法提取总 RNA 前加入低剂量的溶菌酶可以提高 dsRNA 产量。dsRNA 的定量目前主要依靠 RT-qPCR、Northern blotting、ELISA、凝胶电泳、微量吸光度法(使用 NanoDrop 2000)等方法, 若能根据现有的 dCas13a 系统或荧光 RNA 适配体开发出一个检测 dsRNA 的传感器, 在切割/结合目标 RNA 后释放荧光信号, 实现特异信号的级联放大, 既能方便地检测 dsRNA 的数量, 又可以据此筛选生产能力更强的工程菌株^[51-52]。或利用吖啶橙等荧光染料, 进行活体染色或与纯化后的 dsRNA 共孵育, 通过绘制标准曲线对 dsRNA 进行定量, 既可以提高效率, 又可以降低成本^[53-54]。

提高 dsRNA 的产量通常可以从增加 dsRNA 产量和减少其降解 2 个方面考虑。可以采取以下措施: (1) 增强转录能力。可以通过增

加质粒的拷贝数来增加转录模板的数量,选择更强的启动子来增加转录起始频率和强度,使用更高效的终止子来防止过长的 RNA 链合成。(2) 按需选择表达质粒的构建方式。两种表达质粒在转录后都需要进行退火,单个启动子产生的 dsRNA 数量与长度理论上与转录出的 ssRNA 相同,而将启动子置于靶基因两端所产生的 dsRNA 数量理论上是转录出的 ssRNA 数量的一半。(3) 结合蛋白。通过表达相应结合蛋白与 dsRNA 结合从而保护 dsRNA 免受核酸酶降解。(4) 优化发酵条件。可以通过调整培养基、诱导剂的添加量和诱导时间等发酵条件,把控菌体量与 dsRNA 积累量间的平衡来提高 dsRNA 的产量。(5) 基因组工程改造宿主。可以通过基因工程技术系统性地改造宿主的 RNA 合成与代谢网络,提升菌株合成 RNA 的能力并减少 RNA/dsRNA 降解酶的表达,从而提高 dsRNA 的产量。同时可以优化 dsRNA 的提取工艺,选择适当的提取方法和条件,以提高 dsRNA 的纯度和产量。

3 展望

研究表明仅有 0.1% 的施用农药能进到目标害虫体内,其余则会造成空气、土壤、水源等污染^[55]。而双链 RNA 农药是一种绿色环保的农药,无残留污染的同时可以高效靶向并抑制病虫害的关键基因表达。目前限制双链 RNA 农药大规模使用的主要因素之一是生产成本的问题,构建工程菌株是实现双链 RNA 农药大规模生产的重要途径。目前主要利用大肠杆菌作为工程菌生产 dsRNA,应尝试更多的菌种如芽孢、假单胞菌等。在工程菌株的构建中,单种工程菌株通常难以满足生产所有类型产品的需求。通过深入理解并合理利用不同宿主细胞的优势,并结合理性设计与改造策略,有望实现特

定 dsRNA 生产的最优化,从而提升其生产效率与质量。

现有的 dsRNA 表达系统的设计与构建主要有 2 种:一种是以 2 个不同方向的启动子控制一段靶标序列的表达,另一种是在启动子后将靶标序列一正一反放置。这 2 种表达质粒都是先转录为单链 RNA 再按照碱基互补配对原则以分子间配对或分子内部折叠的形式形成 dsRNA,因此 dsRNA 的生产水平与宿主细菌体内 RNA 的转录水平正相关,如果能通过基因组工程改造从而提高宿主菌合成 ssRNA 的能力,将能够实现 dsRNA 的产量提升。因此,对核苷酸代谢通路进行合理化改造、调节核苷酸代谢通路中关键酶的表达水平将是一种有效的方法,但目前尚未见较为深入的系统研究。构建 dsRNA 工程菌株需要尽可能将物质和能量流向目标产品,并保持细胞的良好生长状态和较高的菌密度。通过诱变或适应性进化能够筛选到具有更优性状菌株,如提高生长性能、提高对高浓度 RNA 的耐受能力等^[56-57]。敲除背景蛋白、理性设计并改造代谢通路和基因组精简能够使物质及能量尽可能流向目标产品,减少非必要的代谢负担,提高代谢效率^[58]。

RNAi 技术已被公认为第四代杀虫剂的核心技术。据估计,每 1 万 m² 作物大约需要 2-10 g 的 dsRNA 用于作物保护^[13],目前在工程菌株中,谷氨酸棒杆菌的产量最高,其在 0.3 L 发酵罐中的产量可达到 1.0 g/L^[17]。随着基因编辑与合成生物学技术的进步,未来 dsRNA 生产的产量和效率会不断提高,成本也会不断降低,实现大规模应用前景可期。

REFERENCES

- [1] DEUTSCH CA, TEWKSBURY JJ, TIGCHELAAR M, BATTISTI DS, MERRILL SC, HUEY RB, NAYLOR RL. Increase in crop losses to insect pests in a warming

- climate[J]. *Science*, 2018, 361(6405): 916-919.
- [2] HOUGH J, HOWARD JD, BROWN S, PORTWOOD DE, KILBY PM, DICKMAN MJ. Strategies for the production of dsRNA biocontrols as alternatives to chemical pesticides[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022, 10: 980592.
- [3] SPARMANN A, VOGEL J. RNA-based medicine: from molecular mechanisms to therapy[J]. *The EMBO Journal*, 2023, 42(21): e114760.
- [4] WU JE, YANG J, CHO WC, ZHENG YD. Argonaute proteins: Structural features, functions and emerging roles[J]. *Journal of Advanced Research*, 2020, 24: 317-324.
- [5] 汪芳, 党聪, 金虹霞, 肖山, 钟馥骏, 方琦, 姚洪渭, 叶恭银. RNA 干扰技术在害虫防治中的应用及其安全性[J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2022, 48(6): 683-691.
WANG F, DANG C, JIN HX, XIAO S, ZHONG FJ, FANG Q, YAO HW, YE GY. Application of RNA interference technology in pest control and its safety[J]. *Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences)*, 2022, 48(6): 683-691 (in Chinese).
- [6] 路子琪, 王静, 张震, 王教瑜, 孙国仓, 林福星. 基于 RNAi 的生物农药研究进展[J]. *浙江农业学报*, 2024, 36(4): 968-977.
LU ZQ, WANG J, ZHANG Z, WANG JY, SUN GC, LIN FC. Research progress of biological pesticides based on RNAi[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2024, 36(4): 968-977 (in Chinese).
- [7] 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 RB, LI HC, MIAO XX. Commercialization Status and Existing Problems of RNA Biopesticides[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2022, 55(15): 2949-2960 (in Chinese).
- [8] 关梅, 晁子健, 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 ZJ, YAN S, SHEN J. Research status and development prospect of RNA pesticide[J]. *Modern Agrochemicals*, 2023, 22(2): 11-18 (in Chinese).
- [9] GUAN RB, CHU DD, HAN XY, MIAO XX, LI HC. Advances in the development of microbial double-stranded RNA production systems for application of RNA interference in agricultural pest control[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021, 9: 753790.
- [10] 张建珍, 柴林, 史学凯, 高璐, 范云鹤. RNA 干扰技术与害虫防治[J]. *山西大学学报(自然科学版)*, 2021, 44(5): 980-987.
ZHANG JZ, CHAI L, SHI XK, GAO L, FAN YH. RNA interference technology and pest control[J]. *Journal of Shanxi University (Natural Science Edition)*, 2021, 44(5): 980-987 (in Chinese).
- [11] YANG L, TIAN Y, PENG YY, NIU JZ, WANG JJ. Expression dynamics of core RNAi machinery genes in pea aphids upon exposure to artificially synthesized dsRNA and miRNAs[J]. *Insects*, 2020, 11(2): 70.
- [12] TANING CN, ARPAIA S, CHRISTIAENS O, DIETZ-PFEILSTETTER A, JONES H, MEZZETTI B, SABBADINI S, SORTEBERG HG, SWEET J, VENTURA V, SMAGGHE G. RNA-based biocontrol compounds: current status and perspectives to reach the market[J]. *Pest Management Science*, 2020, 76(3): 841-845.
- [13] ZOTTI M, DOS SANTOS EA, CAGLIARI D, CHRISTIAENS O, TANING CNT, SMAGGHE G. RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes[J]. *Pest Management Science*, 2018, 74(6): 1239-1250.
- [14] MA ZZ, ZHOU H, WEI YL, 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.
- [15] YIN GH, SUN ZN, LIU N, ZHANG L, SONG YZ, ZHU CX, WEN FJ. Production of double-stranded RNA for interference with TMV infection utilizing a bacterial prokaryotic expression system[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 84(2): 323-333.
- [16] HASHIRO S, MITSUHASHI M, YASUEDA H. Overexpression system for recombinant RNA in *Corynebacterium glutamicum* using a strong promoter derived from corynephage BFK20[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2019, 128(3): 255-263.
- [17] HASHIRO S, CHIKAMI Y, KAWAGUCHI H, KRYLOV AA, 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.
- [18] NIEHL A, SOININEN M, PORANEN MM, HEINLEIN M. Synthetic biology approach for plant protection using dsRNA[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, 16(9): 1679-1687.
- [19] PARK MG, KIM WJ, CHOI JY, KIM JH, PARK DH, KIM JY, WANG MH, JE YH. Development of a *Bacillus thuringiensis* based dsRNA production platform to control sacbrood virus in *Apis cerana*[J]. *Pest Management Science*, 2020, 76(5): 1699-1704.
- [20] LEONARD SP, POWELL JE, PERUTKA J, GENG P, HECKMANN LC, HORAK RD, DAVIES BW, ELLINGTON AD, BARRICK JE, MORAN NA. Engineered symbionts activate honey bee immunity and limit pathogens[J]. *Science*, 2020, 367(6477): 573-576.
- [21] WHITTEN MMA, FACEY PD, del SOL R, FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ LT, EVANS MC, MITCHELL JJ, BODGER OG, DYSON PJ. Symbiont-mediated RNA interference in insects[J]. *Proceedings Biological Sciences*, 2016, 283(1825):

- 20160042.
- [22] MYSORE K, LI P, WANG CW, HAPAIRAI LK, SCHEEL ND, REALEY JS, SUN LH, ROETHELE JB, SEVERSON DW, WEI N, DUMAN-SCHEEL M. Characterization of a yeast interfering RNA larvicide with a target site conserved in the synaptotagmin gene of multiple disease vector mosquitoes[J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2019, 13(5): e0007422.
- [23] ÁLVAREZ-SÁNCHEZ AR, ROMO-QUINONES C, ROSAS-QUIJANO R, REYES AG, BARRAZA A, MAGALLÓN-BARAJAS F, ANGULO C, MEJÍA-RUÍZ CH. Production of specific dsRNA against white spot syndrome virus in the yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. *Aquaculture Research*, 2018, 49(1): 480-491.
- [24] LI Y, DU JW, XU Y, GAO JQ, SONG YZ, ZHU CX. RNAi silencing of rice black-streaked dwarf virus *PI0* and two insect vector genes to reduce virus transmission protects rice plants against RBSDV[J]. *Journal of Plant Interactions*, 2021, 16(1): 83-92.
- [25] TIMMONS L, COURT DL, 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.
- [26] ZHU F, XU JJ, PALLI R, FERGUSON J, PALLI SR. Ingested RNA interference for managing the populations of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*[J]. *Pest Management Science*, 2011, 67(2): 175-182.
- [27] HASHIRO S, MITSUHASHI M, CHIKAMI Y, KAWAGUCHI H, NIIMI T, YASUEDA H. Construction of *Corynebacterium glutamicum* cells as containers encapsulating dsRNA overexpressed for agricultural pest control[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(20): 8485-8496.
- [28] MAKEYEV EV, GRIMES JM. RNA-dependent RNA polymerases of dsRNA bacteriophages[J]. *Virus Research*, 2004, 101(1): 45-55.
- [29] LEVANOVA AA, PORANEN MM. Utilization of bacteriophage phi6 for the production of high-quality double-stranded RNA molecules[J]. *Viruses*, 2024, 16(1): 166.
- [30] GAN JH, TROPEA JE, AUSTIN BP, COURT DL, WAUGH DS, JI XH. Structural insight into the mechanism of double-stranded RNA processing by ribonuclease III[J]. *Cell*, 2006, 124(2): 355-366.
- [31] MYSORE K, HAPAIRAI LK, SUN LH, HARPER EI, CHEN YY, EGGLESON KK, REALEY JS, SCHEEL ND, SEVERSON DW, WEI N, DUMAN-SCHEEL M. Yeast interfering RNA larvicides targeting neural genes induce high rates of *Anopheles* larval mortality[J]. *Malaria Journal*, 2017, 16(1): 461.
- [32] MA N, McALLISTER WT. In a head-on collision, two RNA polymerases approaching one another on the same DNA may pass by one another[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2009, 391(5): 808-812.
- [33] 崔洁. 一种基于 Red/ET 重组工程的生物元件库高效构建方法及应用[D]. 济南: 山东大学, 2023.
- CUI J. An efficient construction method of biological component library based on Red/ET recombination engineering and its application[D]. Jinan: Shandong University, 2023 (in Chinese).
- [34] 于广乐. 细菌高效基因转录激活系统的开发和应用[D]. 济南: 山东大学, 2023.
- YU GL. Development and application of efficient gene transcription activation system in bacteria[D]. Jinan: Shandong University, 2023 (in Chinese).
- [35] DELGADO-MARTÍN J, VELASCO L. An efficient dsRNA constitutive expression system in *Escherichia coli*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(16/17): 6381-6393.
- [36] ZHANG Y, GUO ML, ZHANG XY, ZHANG N, ZHU P, WANG H. Multiple optimizations of recombinant plasmid for improving expression of Hepatitis B core antigen in *Escherichia coli*[J]. *Protein Expression and Purification*, 2022, 198: 106127.
- [37] LIU MZ, LI ZH, HUANG JF, YAN JJ, ZHAO GP, ZHANG YF. OptoLacI: optogenetically engineered lactose operon repressor LacI responsive to light instead of IPTG[J]. *Nucleic Acids Research*, 2024, 52(13): 8003-8016.
- [38] BAUM JA, CHRISTIAN AT, EVDOKIMOV A, MOSHIRI F, WEAVER LM, ZHANG H. Compositions and methods for the improved production and delivery of RNA by efficient transcription termination: US20160145630[P]. 2016-05-26.
- [39] PEISLEY A, HUR S. Multi-level regulation of cellular recognition of viral dsRNA[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2013, 70(11): 1949-1963.
- [40] FÁTYOL K, FEKETE KA, LUDMAN M. Double-stranded-RNA-binding protein 2 participates in antiviral defense[J]. *Journal of Virology*, 2020, 94(11): e00017-20.
- [41] GUPTA AK, TATINENI S. RNA silencing suppression mechanisms of *Triticum* mosaic virus P1: dsRNA binding property and mapping functional motifs[J]. *Virus Research*, 2019, 269: 197640.
- [42] BAUERNFRIED S, SCHERR MJ, PICHLMAIR A, DUDERSTADT KE, HORNUNG V. Human NLRP1 is a sensor for double-stranded RNA[J]. *Science*, 2021, 371(6528): eabd0811.
- [43] ESSER-NOBIS K, HATFIELD LD, GALE M Jr. Spatiotemporal dynamics of innate immune signaling via RIG-I-like receptors[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(27): 15778-15788.
- [44] KU J, KIM S, PARK J, KIM TS, KHARBASH R, SHIN EC, CHAR K, KIM Y, LI S. Reactive polymer targeting dsRNA as universal virus detection platform with enhanced sensitivity[J]. *Biomacromolecules*, 2020, 21(6): 2440-2454.
- [45] MA ZZ, ZHENG Y, CHAO ZJ, CHEN HT, ZHANG YH, YIN MZ, SHEN J, YAN S. Visualization of the process of a nanocarrier-mediated gene delivery:

- stabilization, endocytosis and endosomal escape of genes for intracellular spreading[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2022, 20(1): 124.
- [46] LI MS, MA ZZ, PENG M, LI L, YIN MZ, YAN S, SHEN J. A gene and drug co-delivery application helps to solve the short life disadvantage of RNA drug[J]. *Nano Today*, 2022, 43: 101452.
- [47] 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]. *Biotechnology Reports*, 2018, 20: e00292.
- [48] 计慧君, 林羿光, 付彤煜, 郑思春. 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.
JI HJ, LIN YG, FU TY, ZHENG SC. Optimization of conditions for double stranded RNA production based on bacterial systems[J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2023, 45(3): 703-710 (in Chinese).
- [49] 常瑞, 王俊, 付开赞, 廖兰兰, 丁新华, 何江, 郭文超, 吐尔逊·阿合买提, 任羽. 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.
CHANG R, WANG J, FU KY, LIAO LL, DING XH, HE J, GUO WC. Comparative Study on the Effect of 4 kind of dsRNA Extraction Methods form Prokaryotic Expression Double-stranded RNA[J]. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2021, 58(4): 700-711 (in Chinese).
- [50] FIGUEIREDO PRATES LH, MERLAU M, RÜHL-TEICHNER J, SCHETELIG MF, HÄCKER I. An optimized/scale up-ready protocol for extraction of bacterially produced dsRNA at good yield and low costs[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(11): 9266.
- [51] TONG XH, ZHANG K, HAN Y, LI TL, DUAN M, JI RJ, WANG XG, ZHOU X, ZHANG Y, YIN H. Fast and sensitive CRISPR detection by minimized interference of target amplification[J]. *Nature Chemical Biology*, 2024, 20(7): 885-893.
- [52] WANG TH, SIMMEL P FC. Switchable fluorescent light-up aptamers based on riboswitch architectures[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2023, 62(41): e202302858.
- [53] MU X, GREENWALD E, AHMAD S, HUR S. An origin of the immunogenicity of *in vitro* transcribed RNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(10): 5239-5249.
- [54] BILGI V, FOSU-NYARKO J, JONES MGK. Using vital dyes to trace uptake of dsRNA by green peach aphid allows effective assessment of target gene knockdown[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(1): 80.
- [55] ZONG M, YU C, LI J, SUN D, WANG J, MO Z, QIN C, YANG D, ZHANG Z, ZENG Q, LI C, MA K, WAN H, LI J, HE S. Redox and Near-Infrared Light-Responsive Nanoplatfor for Enhanced Pesticide Delivery and Pest Control in Rice: Construction, Efficacy, and Potential Mechanisms[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2023, 15(35): 41351-41361.
- [56] MAVROMMATI M, DASKALAKI A, PAPANIKOLAOU S, AGGELIS G. Adaptive laboratory evolution principles and applications in industrial biotechnology[J]. *Biotechnology Advances*, 2022, 54: 107795.
- [57] VOLK MJ, TRAN VG, TAN SI, MISHRA S, FATMA Z, BOOB A, LI HX, XUE P, MARTIN TA, ZHAO HM. Metabolic engineering: methodologies and applications[J]. *Chemical Reviews*, 2023, 123(9): 5521-5570.
- [58] LIU JQ, ZHOU HB, YANG ZY, WANG X, CHEN HN, ZHONG L, ZHENG WT, NIU WJ, WANG S, REN XM, ZHONG GN, WANG Y, DING XM, MÜLLER R, ZHANG YM, BIAN XY. Rational construction of genome-reduced Burkholderiales chassis facilitates efficient heterologous production of natural products from proteobacteria[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 4347.