

·论 著·

# 利用无缝克隆方法构建埃及伊蚊表皮蛋白基因 *AaCPR100A* 双向启动子苏云金芽孢杆菌穿梭载体

马晨昕<sup>1,2</sup>, 张莹心<sup>1,2</sup>, 刘思寒<sup>1,2</sup>, 何佳利<sup>3</sup>, 陈久凯<sup>1,2</sup>, 张文飞<sup>3\*</sup>, 廖承红<sup>1,2\*</sup>, 韩谦<sup>1,2</sup>

1. 海南大学生命科学学院, 海南 海口 570228; 2. 海南大学全健康研究院, 海南 海口 570228;  
3. 热带岛屿生态学教育部重点实验室, 海南师范大学生命科学院, 海南 海口 571158

**摘要:** **目的** 构建表达 dsRNA 的双向启动子以及靶基因 *AaCPR100A* 的大肠杆菌-苏云金芽孢杆菌穿梭载体 pHT315-*AaCPR100A*。 **方法** 以苏云金芽孢杆菌 pSVP27A 质粒为模板通过 PCR 扩增苏云金芽孢杆菌 Cry3A 正向启动子 *Pro-I*(+); 以埃及伊蚊 RNA 反转录为 cDNA 为模板, 扩增靶基因 *AaCPR100A*; 将大肠-苏云金穿梭载体 pHT315 质粒经 *Hind* III 和 *Sal* I 双酶切线性化; 按照转录方向将正向启动子与靶基因通过无缝克隆插入穿梭载体 pHT315 中; 以生物合成的含有 Cry3A 反向启动子序列的质粒为模版, 经 PCR 克隆扩增 *Pro-I*(-) 反向启动子; 将含有正向启动子与靶基因的中间载体通过 *EcoR* I 限制性酶切线性化, 按转录方向在靶基因下游通过无缝克隆插入反向启动子。 **结果** 琼脂糖凝胶电泳检测, 正向启动子、靶基因 *AaCPR100A* 和反向启动子 PCR 产物条带清晰, 质量良好, 可用于无缝克隆实验; 经无缝克隆连接双向启动子以及靶基因片段后, 对含有重组载体 pHT315-*AaCPR100A* 的重组质粒进行 PCR 验证, 在重组载体中成功扩增正向启动子、靶基因片段以及反向启动子, 经核苷酸测序验证双向启动子序列以及靶基因序列测序结果与序列比对结果基本一致, 符合构建载体元件的要求, 证明重组载体构建成功。 **结论** 本研究利用无缝克隆技术成功构建含有双向启动子以及靶基因的重组穿梭载体, 为构建表达伊蚊表皮蛋白基因 *AaCPR100A* dsRNA 的苏云金芽孢杆菌工程菌奠定基础。

**关键词:** 埃及伊蚊; 无缝克隆; *AaCPR100A*; 苏云金芽孢杆菌; dsRNA

中图分类号: R384.1 文献标识码: A 文章编号: 1009-9727(2023)11-1141-06

DOI: 10.13604/j.cnki.46-1064/r.2023.11.03

## Construction a shuttle vector containing *AaCPR100A* epidermal protein gene of *Aedes aegypti* with two spore-producing-dependent promoters in *Bacillus thuringiensis* by in-fusion cloning

MA Chenxin<sup>1,2</sup>, ZHANG Yingxin<sup>1,2</sup>, LIU Sihan<sup>1,2</sup>, HE Jiali<sup>3</sup>, CHEN Jiukai<sup>1,2</sup>, ZHANG Wenfei<sup>3</sup>,  
LIAO Chenghong<sup>1,2</sup>, HAN Qian<sup>1,2</sup>

1. School of Life Science, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. One Health Institute, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 3. Ministry of Education Key Laboratory for Ecology of Tropical Islands, School of Life Science, Hainan Normal University, Haikou, Hainan 571158, China

Corresponding authors: LIAO Chenghong, E-mail: liaochh@hainanu.edu.cn; ZHANG Wenfei, E-mail: wfzhang@hainanu.edu.cn

**Abstract:** **Objective** To construct a shuttle vector pHT315-*AaCPR100A* with two spore-producing-dependent promoters and the target gene *AaCPR100A* in *Escherichia coli*-*Bacillus thuringiensis*. **Methods** The forward promoter of Cry3A, named *Pro-I* (+), was amplified by PCR using pSVP27A plasmid as the template, and the target gene *AaCPR100A* was amplified using *Aedes aegypti* RNA reverse conversion cDNA as the template. The plasmid pHT315 was linearized by digestion with *Hind* III and *Sal* I. The forward promoter and the target gene were inserted into the linearized vector pHT315 successively by in-fusion cloning according to the transcription direction. The synthesized plasmid containing the Cry3A reverse promoter sequence was used as the template, and the *Pro-I* (-) reverse promoter was amplified by PCR. The intermediate vector containing the forward promoter and the target gene was linearized by *EcoR* I restriction enzyme, and the reverse promoter was inserted downstream of the target gene by in-fusion cloning in the direction of transcription. **Results** By agarose gel electrophoresis, the forward promoter, target gene *AaCPR100A* and reverse promoter bands were clear and of good quality, which could be used for in-fusion cloning experiments. The two spore-producing-dependent promoters and target gene fragments were connected by In-fusion cloning. The recombinant vector pHT315-*AaCPR100A* was verified by PCR. The forward promoter, target gene fragment and reverse promoter were successfully amplified in the recombinant vector. Nucleotide

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 31960703, No. U22A20363); 海南省重大科技计划项目 (No. ZDKJ2021035)。

作者简介: 马晨昕 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 病媒生物防控。

\*通信作者: 廖承红, E-mail: liaochh@hainanu.edu.cn; 张文飞, E-mail: wfzhang@hainanu.edu.cn

sequencing verified that the sequencing results of the bidirectional promoter sequence and the target gene sequence were basically consistent with the sequence alignment results, which met the requirements of the construction of vector elements and proved that the recombinant vector was successfully constructed. **Conclusions** Based on the above results, this study proves that the recombinant shuttle vector with two spore-producing-dependent promoters can be successfully constructed by in-fusion cloning technology, laying the foundation for the construction of engineered *Bacillus thuringiensis* expressing dsRNA of *AaCPR100A*.

**Keywords:** *Aedes aegypti*; in-fusion cloning; *AaCPR100A*; *Bacillus thuringiensis*; dsRNA

埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)是登革热、寨卡和基孔肯尼亚等病毒的主要传播媒介<sup>[1-2]</sup>。近年来化学杀虫剂的广泛使用导致许多地区生态环境的破坏以及不同程度的杀虫剂抗性问题的。因此,针对埃及伊蚊新型环境友好杀虫剂的开发受到人们的关注<sup>[3]</sup>。

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, *Bt*)是革兰氏阳性菌,能产生对双翅目昆虫有较好的毒杀作用的伴孢晶体蛋白<sup>[4]</sup>。作为研究最深入的杀虫微生物,构建工程菌*Bt*方面的研究已经取得许多成果。研究人员重组了苏云金杆菌以色列亚种(*Bti*)的杀蚊毒素基因 *Cry4Ba* 和 *Cry11Aa* 与球形芽孢杆菌(*Bs*)的二元毒素基因(binary toxin, *btx*),再将 *Bti* 杀蚊毒素基因 *Cry4Aa*、*Cry4Ba*、*Cry11Aa* 及 *btx* 单独或组合表达,所得工程菌株对敏感和抗性库蚊的毒力均有提高,另外发现有部分工程菌克服了蚊幼虫对 *Bs* 的抗性<sup>[5]</sup>。有研究发现,构建含有编码鞘翅目特异性杀虫蛋白的 *Cry3Aa7* 基因的重组质粒 pSTK-3A,将其导入野生苏云金芽孢杆菌中,发现该质粒对鳞翅目害虫的毒力增强<sup>[6]</sup>。

RNAi 是一种发生在细胞内的目标基因转录后沉默的重要技术,dsRNA 沉默生物体内互补内源性 mRNA 的转录翻译过程,影响相关蛋白质的合成<sup>[7]</sup>,已成为新型可持续的有害昆虫防控的重要工具<sup>[8-9]</sup>。基于 RNAi 的生物杀虫剂控制蚊虫数量的一个重要优势是能够特异性针对单个蚊虫种类,从而减少非特异性农药的使用<sup>[10]</sup>。利用微生物合成的 dsRNA,并应用于活微生物中的策略被称为细菌介导的 RNAi。近年来,研究者利用 *Bt* 介导昆虫的 RNA 干扰,主要方法是使用基因工程技术使外源基因在 *Bt* 中高效表达,构建 *Bt* 重组工程菌。最常用的方法是使用穿梭表达载体,如 pHT304 或 pHT315 等载体,可在大肠杆菌和苏云金芽孢杆菌中大量复制,在大肠杆菌中大量克隆含有目的基因的重组质粒,分离后通过电击法将其转入目标 *Bt* 菌株中,表达目的片段。大多数研究主要围绕目标基因的 dsRNA 的双向启动子启动转录表达。周毓青<sup>[11]</sup>通过 pHT315 载体成功构建了含有双向启动子以及目的基因的重组质粒,并成功转化苏云金芽孢杆菌。PARK 等<sup>[12]</sup>使用 *Cyt1Aa* 启动子,而 JIANG 等<sup>[13]</sup>使用 *Pro3α* 启动子。由此可见,构建利用穿梭载体构建重组穿梭表达系统,在 *Bt* 中表达 dsRNA 从而介导

RNAi,将为开发新型 *Bt* 生物杀虫剂提供思路。

无缝克隆(in fusion-cloning)与传统 PCR 克隆相似,都是利用 DNA 的黏性末端进行互补配对,但不同的是,无缝克隆的粘性末端是通过 T5 核酸外切酶沿着 5'→3' 方向降解 DNA 形成,而非双酶切产生。无缝克隆可以高效地将 PCR 产物定向克隆到线性化载体中,相较于传统的构建重组载体的方法,无缝克隆拥有可以代替 DNA 连接酶、不需要考虑载体的酶切位点,并可同时插入多个目的片段等优点<sup>[14]</sup>。有研究表明,利用无缝克隆技术可将多片段插入重组载体,构建表达融合蛋白的载体<sup>[15]</sup>。无缝克隆技术针对多片段克隆载体的构建较双酶切克隆更为快捷高效。

埃及伊蚊 *AaCPR100A* 是一种表皮结构蛋白,前期研究发现 RNA 干扰 *AaCPR100A* 基因后对蚊虫的幼虫具有高度致死性<sup>[16]</sup>,这表明该基因对埃及伊蚊的生长发育以及埃及伊蚊角质层和柔性角质层的形成非常重要。本研究利用无缝克隆技术,选取 *AaCPR100A* 基因作为 *Bt* 重组载体插入目的基因,构建含有 *Bt* 毒素蛋白 *Cry3A* 的正反向启动子序列和 *AaCPR100A* 基因的重组穿梭载体,为下一步利用苏云金芽孢杆菌表达目的基因 dsRNA,达到抑制埃及伊蚊内源目的基因的表达,从而实现生物防控的目的。

## 1 材料与方法

1.1 埃及伊蚊的饲养 埃及伊蚊来自于军事科学院军事医学研究院微生物流行病学研究所,将蚊卵保存于温度(26±1)℃,湿度(75±5)%的一次性方形培养皿中。1龄期至4龄期幼虫饲养于温度(26±1)℃去氯水中,喂食小鼠饲料[无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级],蛹期收入蚊笼中羽化,成蚊阶段使用8%蔗糖水饲喂。

1.2 启动子及目的片段的获得 利用 CE Design 软件设计得到 *AaCPR100A* 基因、*Pro-1(+)* 及 *Pro-1(-)* 的 PCR 引物(表1)。

Trizol 法提取埃及伊蚊成蚊 RNA,用 2% 琼脂糖凝胶电泳验证 RNA 的完整性,用 PrimeScript™ RT 试剂试剂盒(TaKaRa, RR047A)反转录合成 cDNA,扩增目的基因片段。以 pSVP27A 质粒为模板进行 PCR 扩增得到 *Cry3A* 启动子的正向序列 [*Pro-1(+)*],以生工生物公司合成的含 *Cry3A* 启动子反向序列 [*Pro-1(-)*] 的质

粒为模板扩增得到 *Pro-1(-)* 片段。PCR 反应程序为 95 °C 下预变性 10 min, 95 °C 变性 10 s, 55 °C 10 s, 72 °C 30 s, 进行 35 个循环, 72 °C 延伸 7 min, 每个样品进行 3 次重复实验。使用 SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒(生工生物工程有限公司)对目的片段的 PCR 产物进行纯化。

**表 1 埃及伊蚊 *AaCPR100A* 基因、*Pro-1(+)* 及 *Pro-1(-)* 的 PCR 引物序列**

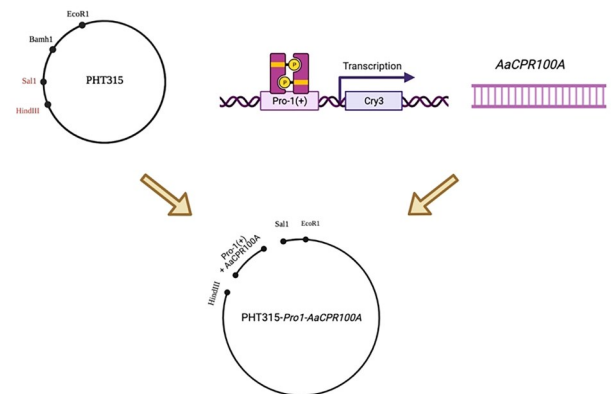
**Table 1 PCR primer sequences of *AaCPR100A* gene, *Pro-1(+)* and *Pro-1(-)***

| 引物名称                | 引物序列   |
|---------------------|--|
| Primer name         | Primer sequence (5'→3')                                      |
| <i>AaCPR100A</i> -F | GGAGGAAGAAAAATGTTTCAGATTTATTCTGGTAT-CAACG                    |
| <i>AaCPR100A</i> -R | CTTGCATGCCTGCAGGTCGACTTAAACCTTGTT-GAAGGTGTAGCTG              |
| <i>Pro-1(+)</i> F   | AAAACGACGGCCAGTGAATTCTTAAATGAATATG-TAAATATATTTATG            |
| <i>Pro-1(+)</i> -R  | CTGAACATTTTTCTTCTCCCTTTCTTATCATAA                            |
| <i>Pro-1(-)</i> -F  | CCGGGTACCGAGCTCGAATTCAAAAGAAGGAGG-GAAAGAATAGTATTATG          |
| <i>Pro-1(-)</i> -R  | AAAACGACGGCCAGTGAATTCAAATTTACTTATA-CATTTATATAAATACTATTCTTCGC |

**1.3 *Pro-1(+)* 启动子和目的基因重组质粒的构建** 使用限制性内切酶 *Hind III* 和 *Sal I* 对原始质粒 pHT315 进行双酶切, 使质粒线性化。在 37 °C 金属浴中酶切 3 h 后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。切取目的片段的凝胶, 使用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒(生工生物工程有限公司)对目的条带进行回收。利用无缝克隆试剂盒(生工生物工程有限公司)将目的基因 *AaCPR100A* 序列、*Pro-1(+)* 启动子序列与线性化质粒 pHT315 进行连接, 充分混合均匀, 50 °C 反应 35 min, 得到含有靶标基因和上游启动子的重组载体。使用热激法将上述连接体系转化至大肠杆菌感受态细胞 DH5 $\alpha$  中, 培养后菌液使用 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒(生工生物工程有限公司)提取质粒。提取的质粒用 *AaCPR100A* 基因、*Pro-1(+)* 的 PCR 引物对质粒进行 PCR 验证, 验证重组质粒是否能扩增得到 *AaCPR100A* 基因与 *Pro-1(+)* 片段, 并将重组质粒送至生工生物工程有限公司进行测序(图 1)。

**1.4 构建含有 *Pro-1(-)* 启动子的重组质粒** 将 pHT315-*Pro1*-*AaCPR100A* 用限制性内切酶 *EcoR I* 进行单酶切使质粒线性化, 反应结束后利用无缝克隆试剂盒将 *Pro-1(-)* 片段与线性化质粒 pHT315-*Pro1*-*AaCPR100A* 进行连接, 连接体系为: 10  $\mu$ L Seamless cloning master mix, pHT315-*Pro1* (+) -

*AaCPR100A* 质粒 8  $\mu$ L, *Pro-1(-)* PCR 产物 2  $\mu$ L, 充分混合均匀, 50 °C 反应 35 min(图 2)。



注: pHT315. 穿梭载体 pHT315; *Pro-1(+)*. 正向启动子片段; *AaCPR100A*. 目的基因片段。Note: pHT315. shuttle carrier pHT315; *Pro-1(+)*. Positive promoter fragment; *AaCPR100A*. Target gene fragment.

**图 1 pHT315-*Pro1(+)*-*AaCPR100A* 构建过程**  
**Fig. 1 The map of pHT315-*Pro1(+)*-*AaCPR100A* vector construction**

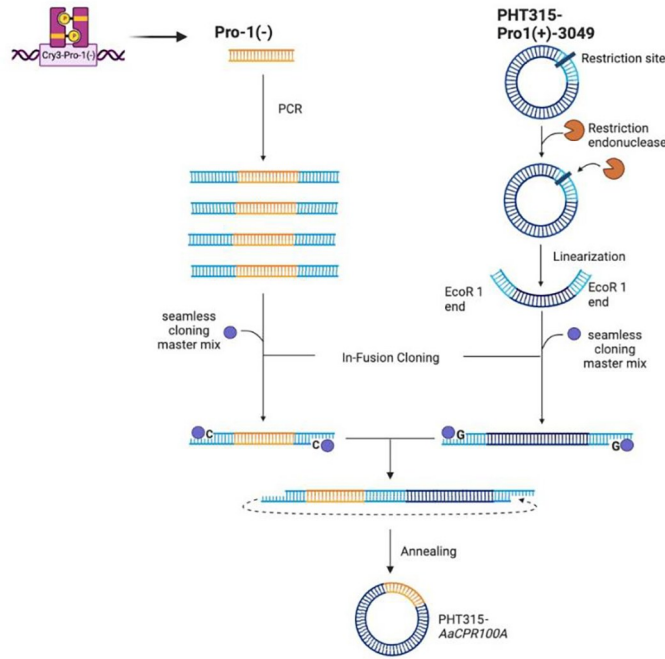
**1.5 重组质粒插入片段的验证** 对连接得到的质粒使用 *AaCPR100A* 基因、*Pro-1(+)* 和 *Pro-1(-)* 的 PCR 引物对重组质粒进行 PCR 扩增, 验证重组质粒是否成功连接 3 个目的片段。最后将重组质粒送至生工生物进行测序。

**2 结果**

**2.1 启动子 *Pro-1(+)* 和 *AaCPR100A* 片段的获得** 构建目的基因 *AaCPR100A* 序列和启动子 *Pro-1(+)* 序列的 RNAi 重组质粒。以 pSVP27A 质粒为模板扩增获取启动子片段 *Pro-1(+)* 和埃及伊蚊幼虫 cDNA 为模板得到相应的目的基因片段, 其中 *Pro-1(+)* 片段大小为 240 bp, 目的基因大小约为 750 bp(图 3~图 4)。

**2.2 启动子 *Pro-1(-)* 的获得** 由于 *Pro-1(-)* 启动子序列较难获得, 因此以生物合成得到的含有反向启动子序列的大肠杆菌菌株质粒为模板进行 PCR 扩增, 扩增得到的片段大小都为 240 bp(图 5)。以上扩增片段均进行测序, 结果与同源序列比对, 结果显示克隆序列与目的序列基本一致, 符合构建载体元件的要求。

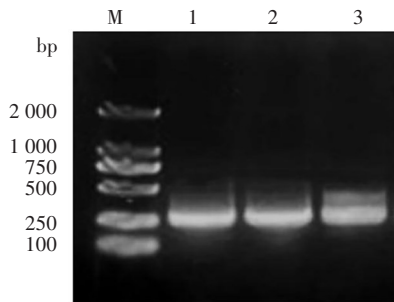
**2.3 pHT315-*AaCPR100A* 重组质粒的鉴定** 以菌液质粒为模板, RNAi 重组载体 pHT315-*AaCPR100A* 的目的基因 *AaCPR100A* 序列, 启动子 *Pro-1(+)* 序列和启动子 *Pro-1(-)* 3 个片段的 PCR 扩增结果如图 6。前二者扩增得到的片段大小都为 240 bp, 后者大小为 750 bp 左右, 测序结果显示克隆序列与目的序列基本一致, 证明重组穿梭载体 pHT315-*AaCPR100A* 构建成功。



注: pHT315-*Pro1*-*AaCPR100A*. 含有正向启动子与目的片段的中间载体; *Pro-1*(-). 反向启动子片段。Note: pHT315-*Pro1*-*AaCPR100A*. An intermediate vector containing a positive promoter and a target fragment; *Pro-1*(-). Reverse promoter fragment.

图2 反向启动子与pHT315-*Pro1*(+)-*AaCPR100A*连接过程

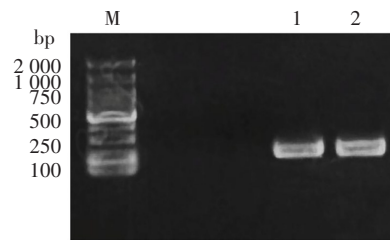
Fig. 2 The process of connecting the reverse promoter to pHT315-*Pro1*(+)-*AaCPR100A*



注: M. DNA loading 2000 marker; 1~3. *Pro-1*(+)启动子片段。  
Note: M. DNA loading 2000 marker; 1-3. *Pro-1*(+) promoter fragment.

图3 启动子序列 *Pro-1*(+)的PCR扩增

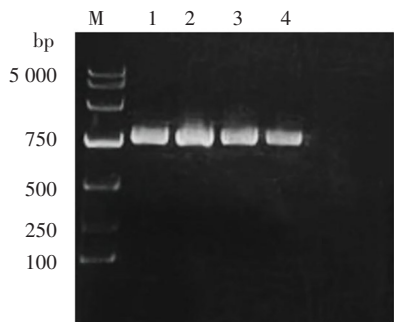
Fig. 3 PCR amplification of promoter sequence *Pro-1*(+)



注: M. DNA loading 2000 marker; 1~2. *Pro-1*(-)启动子片段。  
Note: M. DNA loading 2000 marker; 1-2. *Pro-1*(-) promoter fragment.

图5 启动子序列 *Pro-1*(-)的PCR扩增

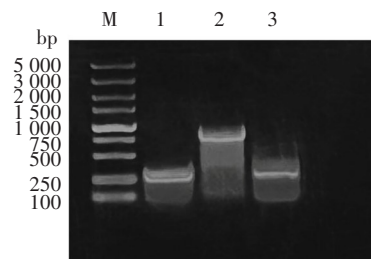
Fig. 5 PCR amplification of *AaCPR100A* and promoter sequence *Pro-1*(-)



注: M. DNA loading 5000 marker; 1~4. *AaCPR100A* 基因片段。  
Note: M. DNA loading 5000 marker; 1-4. *AaCPR100A* gene fragment.

图4 *AaCPR100A*基因的PCR扩增

Fig. 4 PCR amplification of *AaCPR100A* gene



注: M. DNA loading 5000 marker; 1. *Pro-1*(+)启动子片段; 2. *AaCPR100A* 基因片段; 3. *Pro-1*(-)启动子片段。Note: M. DNA loading 5000 marker; 1. *Pro-1*(+) promoter fragment; 2. *AaCPR100A* gene fragment; 3. *Pro-1*(-) promoter fragment.

图6 重组质粒pHT315-*AaCPR100A*的PCR扩增

Fig. 6 PCR amplification of recombinant plasmid pHT315-*AaCPR100A*

### 3 讨论

以往研究证明使用 RNAi 技术成功沉默包括埃及伊蚊、冈比亚按蚊和库蚊等蚊虫的不同生理过程相关的基因,可以影响蚊虫的不同生理功能<sup>[17-19]</sup>。前期研究表明 RNA 干扰埃及伊蚊幼虫 *AaCPR100A* 基因,具有高度致死性<sup>[16]</sup>,这表明该基因对埃及伊蚊幼虫生长发育非常重要。因此,选取 *AaCPR100A* 为此表达系统的目的基因。

无缝克隆技术与传统构建重组载体的技术手段相比,线性化载体的方式更灵活,不需要考虑载体酶切位点,可同时插入多个片段,提高了实验效率以及成功率。在其他表达 dsRNA 的苏云金芽孢杆菌的研究中,均通过限制性内切酶及 T4 连接酶连接的传统克隆方法<sup>[11-12]</sup>。本研究利用无缝克隆技术构建围绕靶基因的双启动子表达载体,证明了无缝克隆技术的可行性,为 RNAi 载体构建方法提供了新思路。

本研究选用高拷贝数大肠-*Bt* 穿梭载体 pHT315 作为表达载体,pHT315 是在 pHT1030 的基础上用 *Bt* 自身的复制子改造的质粒载体,在 *Bt* 中具有较高的稳定性和表达性能<sup>[20]</sup>。研究发现构建工程菌时,若利用其它类型的启动子表达外源基因,可避免转录水平上对  $\sigma$  因子的竞争。从 pSVP27A 质粒中扩增苏云金芽孢杆菌 *Cry3A* 启动子,命名为 *Pro-1(+)*,利用 *Cry3A* 启动子表达 *CryIAc* 基因和 *CryIC* 基因可达到提高表达量的目的<sup>[21]</sup>。*Cry3A* 启动子作为强启动子,其启动表达的 mRNA 的半衰期约为 10 min,是其余细菌的 mRNA 半衰期的 5 倍<sup>[12]</sup>。故选择 *Cry3A* 启动子作为表达 dsRNA 的启动子。

在针对大肠杆菌为 dsRNA 表达宿主的研究中,常见的表达载体为 pL4440 载体,该载体的多克隆位点两侧同样具有一对互为反向的 T7 启动子<sup>[22]</sup>。将插入靶标片段的 pL4440 载体转入大肠杆菌 HT115 (DE3) 菌株后,经过异丙基  $\beta$ -D-1-硫代氨基吡啶苷 (IPTG) 诱导,可以合成大量 T7 RNA 聚合酶;T7 RNA 聚合酶与 L4440 中的 T7 聚合酶启动子结合,介导下游 DNA 序列转录成 RNA,合成了 2 个互补的 RNA,这些 RNA 即连接为目标 dsRNA<sup>[23]</sup>。本研究从 pSVP27A 质粒中扩增 *Cry3A* 启动子,以埃及伊蚊 RNA 反转 cDNA 为模板,扩增靶基因 *AaCPR100A*,按照转录方向将正向启动子与靶基因依次插入线性化载体 pHT315 中。通过生工生物工程(上海)股份有限公司合成反向启动子序列,将含有正向启动子与靶基因的中间载体线通过限制性酶切酶性化后,在靶基因下游插入反向启动子,将 RNAi 需要的表达元件通过无缝克隆连接到线性化载体 pHT315 上,构成包含正向启动子、目的基

因和反向启动子的双启动子 RNAi 表达载体。构建表达 dsRNA 的苏云金芽孢杆菌的基础是双启动子表达载体的构建,与其它表达 dsRNA 的微生物相比,*Bt* 不需要额外添加 IPTG 等诱导表达,因为 *Cry3A* 启动子是一种不依赖芽胞形成的启动子,在苏云金芽孢杆菌生长期即可启动目的基因的转录,且不依赖芽胞形成因子<sup>[24]</sup>。因此 *AaCPR100A* 基因的 dsRNA 可以在苏云金芽孢杆菌培养至生长期末时自发产生。

本研究为下一步将重组载体 pHT315-*AaCPR100A* 转化至 *Bt* 菌中,验证 *Bt* 工程菌的杀蚊活性,探究 *Bt* 介导的埃及伊蚊 RNAi 生物杀虫剂提供了前期基础。

**伦理审查与知情同意** 本研究不涉及伦理批准和患者知情同意

**利益冲突声明** 所有作者声明不存在利益冲突

### 参考文献

- [ 1 ] MURRAY N E A, QUAM M B, WILDER-SMITH A. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects[J]. Clin Epidemiol, 2013, 5: 299-309.
- [ 2 ] BHATT S, GETHING P W, BRADY O J, et al. The global distribution and burden of dengue[J]. Nature, 2013, 496(7446): 504-507.
- [ 3 ] DUSFOUR I, VONTAS J, DAVID J P, et al. Management of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses: advances and challenges[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2019, 13(10): e0007615.
- [ 4 ] 周燕,朱英芝,姜明国. 苏云金芽孢杆菌杀蚊菌株研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(10): 4614-4623.  
ZHOU Y, ZHU Y Z, JIANG M G. Advances research on *Bacillus thuringiensis* mosquitocidal strains[J]. Genom Appl Biol, 2020, 39(10): 4614-4623.(in Chinese)
- [ 5 ] 孙钊,袁志明,张用梅,等. 球形芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌以色列亚种杀蚊毒素间的协同作用[J]. 中国病毒学, 2000, 15(S1): 119-122.  
SUN F, YUAN Z M, ZHANG Y M, et al. Synergism reaction between mosquito-larvicidal genes from *Bacillus sphaericus* and *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*[J]. Virol Sin, 2000, 15(S1): 119-122. (in Chinese)
- [ 6 ] WANG G J, ZHANG J, SONG F P, et al. Engineered *Bacillus thuringiensis* GO33A with broad insecticidal activity against lepidopteran and coleopteran pests[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 72(5): 924-930.
- [ 7 ] CHRISTIAENS O, NIU J Z, NJI TIZI TANING C. RNAi in insects: a revolution in fundamental research and pest control applications [J]. Insects, 2020, 11(7): 415.
- [ 8 ] KUNTE N, MCGRAW E, BELL S, et al. Prospects, challenges and current status of RNAi through insect feeding[J]. Pest Manag Sci, 2020, 76(1): 26-41.
- [ 9 ] DALAISÓN-FUENTES L I, PASCUAL A, GAZZA E, et al. Development of efficient RNAi methods in the corn leafhopper *Dalbulus maidis*, a promising application for pest control[J]. Pest Manag Sci, 2022, 78(7): 3108-3116.
- [ 10 ] ZHANG W. Global pesticide use: profile, trend, cost/benefit and

- [J]. *Microbiol Spectr*, 2022, 10(2): e0156021.
- [15] 张晨露, 崔岩飞, 杨盛娅, 等. 播散性皮疽诺卡菌病误诊肺结核一例[J]. *中国防痨杂志*, 2022, 44(10): 1104-1106.
- [16] DONG G W, CHU P, GUO J, et al. Nontuberculous mycobacterial and *Nocardia* infections mimicking pulmonary tuberculosis: a retrospective study of a general hospital patient population in China[J]. *Journal of medical microbiology*, 2019, 69(9): 1145-1150.
- [17] 柳晓金, 杨娜, 程欢欢, 等. 结核病专科医院24例诺卡菌临床特征分析[J]. *中国热带医学*, 2022, 22(2): 177-180.  
LIU X J, YANG N, CHENG H H, et al. Clinical analysis of 24 cases of nocardiasis in a tuberculosis hospital[J]. *China Trop Med*, 2022, 22(2): 177-180.(in Chinese)
- [18] 程琰, 高杰英, 顾江, 等. 10例诺卡菌感染的病原学鉴定和临床特征[J]. *中国微生态学杂志*, 2022, 34(6): 690-696.  
CHENG Y, GAO J Y, GU J, et al. Identification, clinical characteristics and antimicrobial susceptibility of 10 clinical *Nocardia* infection cases[J]. *Chin J Microecol*, 2022, 34(6): 690-696.(in Chinese)
- [19] 韩云港, 韩俊垒, 陈会会, 等. 42例肺诺卡菌病患者的临床特征及其病原菌耐药性[J]. *中国感染控制杂志*, 2022, 21(7): 668-674.  
HAN Y G, HAN J L, CHEN H H, et al. Clinical characteristics and antimicrobial resistance of pathogens of 42 patients with pulmonary nocardiasis[J]. *Chin J Infect Control*, 2022, 21(7): 668-674.(in Chinese)
- [20] 杜强, 姚萍, 毛旭建, 等. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱在车间洁净室污染同源性分析中的应用[J]. *公共卫生与预防医学*, 2021, 32(5): 43-47.  
DU Q, YAO P, MAO X J, et al. Application of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in the analysis of the pollution homology of clean room in workshop[J]. *J Public Health Prev Med*, 2021, 32(5): 43-47.(in Chinese)
- [21] 黄磊. 诺卡菌分子鉴定方法的研究进展[J]. *检验医学与临床*, 2018, 15(18): 2814-2817.  
HUANG L. Research progress on molecular identification methods of *Nocardia*[J]. *Lab Med Clin*, 2018, 15(18): 2814-2817.(in Chinese)
- [22] TOPIĆ POPOVIĆ N, KAZAZIĆ S P, BOJANIĆ K, et al. Sample preparation and culture condition effects on MALDI-TOF MS identification of bacteria: a review[J]. *Mass Spec Rev*, 2023, 42(5): 1589-1603.
- [23] 杜青岩, 秦中华, 张丽霞. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术对分枝杆菌液体培养系统菌种鉴定的临床研究[J]. *中国人兽共患病学报*, 2021, 37(10): 871-877.  
DU Y Q, QIN Z H, ZHANG L X. Clinical study on the identification of *Mycobacterium* liquid culture system by matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry[J]. *Chin J Zoonoses*, 2021, 37(10): 871-877.(in Chinese)

收稿日期:2023-08-30 编辑:陈景丽 黄艳

(上接第1145页)

- more[J]. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 2018, 8(1): 1.
- [11] 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)
- [12] PARK M G, KIM W J, CHOI J Y, et al. Development of a *Bacillus thuringiensis* based dsRNA production platform to control saebrood virus in *Apis cerana*[J]. *Pest Manag Sci*, 2020, 76(5): 1699-1704.
- [13] JIANG Y X, CHEN J Z, LI M W, et al. The combination of *Bacillus thuringiensis* and its engineered strain expressing dsRNA increases the toxicity against *Plutella xylostella*[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 23(1): 444.
- [14] BERROW N S, ALDERTON D, OWENS R J. The precise engineering of expression vectors using high-throughput In-fusion™ PCR cloning[M]// *High Throughput Protein Expression and Purification*, 2009: 75-90.
- [15] ZHU B G, CAI G F, HALL E O, et al. In-Fusion™ assembly: seamless engineering of multidomain fusion proteins, modular vectors, and mutations[J]. *BioTechniques*, 2007, 43(3): 354-359.
- [16] CHEN J, WU Y C, LU H R, et al. A novel lethal cuticular structural protein, AaCPR100A and its upstream interaction protein, G12-like, function in cuticle and egg shell formation in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*[J]. *BioRxiv*, 2023: 527159.
- [17] WANG H C, WANG Q H, BHOWMICK B, et al. Functional characterization of two clip domain serine proteases in innate immune responses of *Aedes aegypti*[J]. *Parasites Vectors*, 2021, 14(1): 1-13.
- [18] WANG Q H, WANG H, ZHANG Y, et al. Functional analysis reveals ionotropic GABA receptor subunit RDL, is a target site of ivermectin and fluralaner in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*[J]. *Pest Management Science*, 2022, 78(10): 4173-4182.
- [19] WU Q, LI C X, LIU Q M, et al. RNA interference of odorant receptor CquiOR114/117 affects blood-feeding behavior in *Culex quinquefasciatus*[J]. *Acta Trop*, 2020, 204: 105343.
- [20] ARANTES O, LERECLUS D. Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*[J]. *Gene*, 1991, 108(1): 115-119.
- [21] 孙明, 刘子铎, 李林, 等. 细菌基因工程杀虫剂研究进展[J]. *中国病毒学*, 2000, 15(S1): 19-26.  
SUN M, LIU Z D, LI L, et al. Recent development of engineered bacterial pesticides[J]. *Virol Sin*, 2000, 15(S1): 19-26.(in Chinese)
- [22] HOUGH J, HOWARD J D, BROWN S, et al. Strategies for the production of dsRNA biocontrols as alternatives to chemical pesticides [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 10: 980592.
- [23] GUAN R B, CHU D D, HAN X Y, et al. Advances in the development of microbial double-stranded RNA production systems for application of RNA interference in agricultural pest control[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 9: 753790.
- [24] 陈金芝. 苏云金芽孢杆菌介导的小菜蛾精氨酸激酶基因的RNA干扰[D]. 福州: 福建农林大学, 2014.  
CHEN J Z. RNA interference of arginine kinase in *Plutella xylostella* mediated by *Bacillus thuringiensis*[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2014. (in Chinese)

收稿日期:2023-04-17 编辑:王佳燕