

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2024.09.011

# 番茄 *SlERF-H6* 基因 VIGS 沉默载体构建

李立霞, 胡康棣, 姚改芳, 张华

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

**摘要:**番茄(*Solanum lycopersicum*)具有较高的营养价值,深受消费者的喜爱,目前番茄已经成为广泛种植的经济作物之一。乙烯响应因子(ethylene response factor, ERF)是一类植物特有的转录因子。ERF 在植物形态发生、逆境响应、成熟衰老、激素信号转导和代谢物调节等多种生理过程中起重要的调节作用。文章以番茄的 *SlERF-H6*(LOC101259323)基因为研究对象,通过对 *SlERF-H6* 的基因序列进行分析,获得该基因的特异性区域沉默序列。利用同源重组技术成功构建了番茄 *SlERF-H6* 病毒诱导的基因沉默(virus-induced gene silencing, VIGS)载体。为进一步探究番茄 *SlERF-H6* 基因在果实成熟中的作用提供参考。

**关键词:**番茄;病毒诱导的基因沉默(VIGS);*SlERF-H6* 基因;同源重组;载体构建

**中图分类号:**Q78 **文献标志码:**A **文章编号:**1003-5060(2024)09-1232-05

## Construction of VIGS silencing vector of *SlERF-H6* gene in tomato

LI Lixia, HU Kangdi, YAO Gaifang, ZHANG Hua

(School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

**Abstract:** Tomato (*Solanum lycopersicum*) has high nutritional value and is deeply loved by consumers. At present, tomato has become one of the widely planted cash crops. Ethylene response factor(ERF) is a kind of plant-specific transcription factor. ERF plays an important role in a variety of physiological processes, such as plant morphogenesis, stress response, maturation and senescence, hormone signal transduction and metabolite regulation. In this paper, taking the *SlERF-H6*(LOC101259323) gene of tomato as the research object, the specific region silencing sequence of *SlERF-H6* gene was obtained by analyzing the sequence of *SlERF-H6* gene. The virus-induced gene silencing(VIGS) vector of tomato *SlERF-H6* was successfully constructed by homologous recombination technique. The purpose of this study is to provide a reference for further exploring the role of tomato *SlERF-H6* gene in fruit ripening.

**Key words:** tomato(*Solanum lycopersicum*); virus-induced gene silencing(VIGS); *SlERF-H6* gene; homologous recombination; vector construction

## 0 引言

番茄(*Solanum lycopersicum*)是管状花目、茄科、番茄属的一种一年生或多年生草本植物。原产自南美洲,在中国南、北方广泛栽培<sup>[1]</sup>。番茄果实的营养价值丰富,含有糖、蛋白质、纤维素、果胶质、矿物质、维生素、番茄红素等<sup>[2]</sup>。番茄果实

酸甜可口、食用方便,因此深受消费者的喜爱。

乙烯响应因子(ethylene response factor, ERF)是 APETALA2/乙烯响应因子(APETALA2/ethylene response factor, AP2/ERF)超家族的成员之一。AP2/ERF 转录因子含有约60个氨基酸残基的 AP2 DNA 结合区,直接与靶基因启动子上的顺式作用元件脱水反应元件(dehy-

收稿日期:2022-03-29;修回日期:2022-04-16

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31970200;31970312;32170315)

作者简介:李立霞(1993—),女,安徽阜阳人,合肥工业大学硕士生;

张华(1973—),男,江苏徐州人,博士,合肥工业大学教授,博士生导师,通信作者, E-mail: zhanglab@hfut.edu.cn.

dration-responsive element, DRE)、C-重复元件 (C-repeat element, CRT) 或 GCC 盒 (GCC box) 相互作用<sup>[3-5]</sup>。已有大量报道显示, AP2/ERF 家族因子在果实发育成熟过程中发挥重要的调控作用。具有典型 AP2 DNA 结合区的 ERF 转录因子 *Ps-ERF1* 在李 (*Prunus salicina* L.) 果实发育和成熟过程中起调控作用<sup>[6]</sup>。在番茄中, *SlAP2a* 主要通过负调控乙烯和类胡萝卜素生物合成相关基因的表达, 从而对果实成熟产生调控作用<sup>[7]</sup>。*CpERF9* 通过直接与细胞壁修饰基因 *CpPME1/2* 和 *CpPG5* 的启动子结合, 在转录水平上抑制 *CpPME1/2* 和 *CpPG5*, 从而控制番木瓜果实的成熟<sup>[8]</sup>。

在苹果中, *MdERF2* 通过抑制 *MdACS1* 的转录而对乙烯的生物合成和果实成熟产生负面影响。瞬时抑制 *MdERF2* 基因表达的苹果果实表现出更高的乙烯释放量和更快的成熟速度<sup>[9]</sup>。桃是呼吸跃变型果实, 乙烯在桃果实成熟过程中发挥重要作用。*PpERF.E2* 基因在果实发育过程中持续高表达, 并能够激活 *PpACS1* 和 *PpACO1*, 影响乙烯的生物合成进而调控果实成熟<sup>[10]</sup>。因此, ERF 在果实成熟过程中发挥重要的作用。

番茄是茄科植物基因组学研究的参考物种, 也是研究肉质果实发育的模式植物, 本文利用同源重组技术构建番茄 TRV2-*SlERF-H6* 基因沉默载体, 并成功转化农杆菌。为进一步研究 *SlERF-H6* 在番茄果实成熟中的作用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 植物材料

Micro Tom 番茄种子购于广州浩美园艺公司, 种植于合肥工业大学食品与生物工程学院的

番茄种植基地。

#### 1.1.2 菌株

大肠杆菌感受态细胞 DH5 $\alpha$ 、农杆菌感受态细胞 GV3101 均购于上海唯地生物技术有限公司; TRV2 菌株于本实验室 -80 °C 冰箱中保存。

#### 1.1.3 实验试剂

普通 DNA 产物纯化试剂盒 (DP204)、普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (DP209)、质粒提取试剂盒 (DP103) 均购于天根生化科技 (北京) 有限公司; Phanta<sup>®</sup> Super-Fidelity DNA Polymerase (P501-d1)、2 $\times$  Taq Plus Master Mix (P212-01)、ClonExpress One Step Cloning (C112-01) 试剂盒均购于 Vazyme 生物科技有限公司; Prime Script<sup>™</sup> RT Master Mix (RR036A) 试剂盒购于 Takara 生物科技有限公司; Plant Total RNA Isolation (RE-05011) 试剂盒购于 Foregene 生物技术有限公司; 限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Bam*H I 均购于 NEB 公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 总 RNA 的提取与 cDNA 的合成

利用 RNAprep Pure Plant Kit 试剂盒提取野生型番茄叶片中的总 RNA, 具体步骤参照试剂盒说明书。

cDNA 的合成采用 Prime Script<sup>™</sup> RT Master Mix 试剂盒, 反转录体系与反应体条件参照说明书并作适当调整。

### 1.2.2 引物设计与目的片段扩增和纯化

在 Sol Genomics Network (<https://vigs.solgenomics.net/>) 网站的 SGN VIGS Tool 中输入 *SlERF-H6* 的编码序列 (coding sequence, CDS), 获得番茄 *SlERF-H6* 基因大小约为 300 bp 的最佳沉默序列, 然后使用 CE design V1.04 设计引物, 并添加上载体末端同源序列和酶切位点, 上下游酶切位点分别为 *EcoR* I 和 *Bam*H I。引物序列见表 1 所列。

表 1 引物序列

引物名称	引物序列 (5'→3')
<i>SlERF-H6</i> -F	CGTGAGCTCGGTACCGGATCCTACTTATCCTACAGCAGAAATGGCC
<i>SlERF-H6</i> -R	GTGAGTAAGGTTACCGAATCAAATCAGTTTTTGAATCGTCACTTTC

采用 Phanta<sup>®</sup> Super-Fidelity DNA Polymerase 扩增目的片段, 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 体系与条件见说明书, 其中 PCR 反应延伸时间根据目的片段的不

同长度作适当调整。以野生型番茄 cDNA 为模板扩增目的片段。使用普通 DNA 产物纯化试剂盒对扩增产物进行纯化, 具体步骤参照说明书进行。

### 1.2.3 TRV2 载体线性化制备

TRV2 载体线性化采用 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切,反应体系见说明书并作适当调整。酶切产物使用普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行纯化回收,并利用质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测线性化载体的质量浓度。

### 1.2.4 重组反应与转化大肠杆菌

TRV2 线性化载体与目的片段进行重组反应,具体步骤参照 ClonExpress One Step Cloning 试剂盒说明书。目的基因重组产物命名为 TRV2-*SlERF-H6*,将重组产物转化至感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中,具体方法步骤参照说明书。

### 1.2.5 重组质粒的获取

重组产物 TRV2-*SlERF-H6* 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  进行过夜培养后,参照 2 $\times$  Taq Plus Master Mix 说明书进行菌落 PCR 鉴定,反应结束后通过质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物中是否存在目的条带。将阳性单克隆菌液置于 3 mL LB 液体培养基(15  $\mu$ L 10 mg/mL 的卡那霉素)中,于恒温摇床(37  $^{\circ}$ C, 200 r/min)中过夜振荡培养后参照质粒小提试剂盒说明书提取质粒,将获得的重组质粒通过测序公司进行测序比对。

### 1.2.6 农杆菌转化

将测序比对正确的 TRV2-*SlERF-H6* 质粒参照说明书转至农杆菌感受态细胞 GV3101 中。将阳性单克隆菌液置于 3 mL 的 LB 液体培养基(10 mg/mL 的卡那霉素和 10 mg/mL 的利福平各 15  $\mu$ L)中,置于恒温摇床(28  $^{\circ}$ C, 200 r/min)中过夜,振荡培养后按体积比 2 : 1 将菌液与 50% 无菌甘油于冻存管混匀,并置于 -80  $^{\circ}$ C 冰箱保存。

## 2 结果与分析

### 2.1 TRV2-*SlERF-H6* 基因沉默载体的构建

#### 2.1.1 RNA 提取及 *SlERF-H6* 基因 PCR 克隆

使用 Plant Total RNA Isolation 试剂盒提取野生型番茄叶片 RNA, RNA 电泳结果如图 1a 所示,使用 Prime Script<sup>TM</sup> RT Master Mix 试剂盒反转录获得 cDNA,以 cDNA 为模板克隆得到 *SlERF-H6* 的片段,片段纯化后进行琼脂糖凝胶电泳检测,纯化结果如图 1b 所示。

从图 1 可以看出:*SlERF-H6* 的 RNA 共 3 条条带,说明 RNA 提取成功;目的序列长度为 300 bp,条带位置与预期一致,表明 *SlERF-H6*

基因克隆成功。

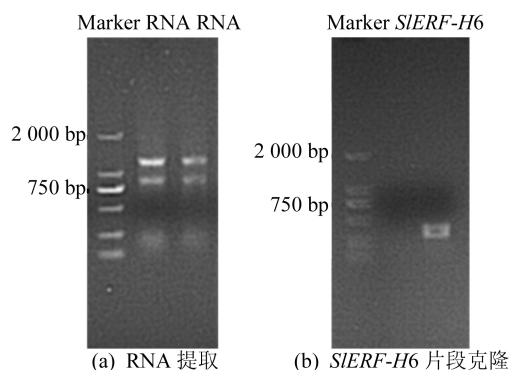


图 1 RNA 提取及 *SlERF-H6* 基因 PCR 克隆电泳图

#### 2.1.2 TRV2 载体线性化分析

活化 TRV2 空载大肠杆菌,使用质粒小提试剂盒提取 TRV2 空载质粒,提取结果如图 2a 所示,从图 2a 可以看出,条带位置与质粒大小(9 663 bp)一致,可用于下一步实验。

使用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Bam*H I 对 100 ng 的 TRV2 空载质粒进行双酶切,使用普通琼脂糖凝胶回收试剂盒对酶切产物进行纯化,纯化产物经质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测其质量浓度,结果如图 2b 所示,从图 2b 可以看出,条带位置正确,可估算结果线性化质粒的质量浓度为 20 ng/ $\mu$ L。

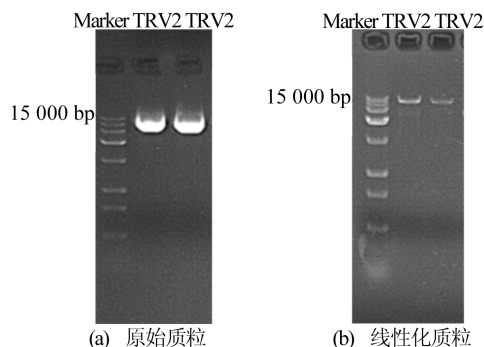


图 2 TRV2 载体酶切及纯化结果

#### 2.1.3 扩增产物与载体的连接转化分析

使用 ClonExpress One Step Cloning Kit 将上述 PCR 纯化产物与 TRV2 线性化载体连接,并转入大肠杆菌感受态细胞 DH5 $\alpha$  内,过夜培养后挑取单克隆使用扩增引物进行 PCR 鉴定,结果如图 3a 所示。由图 3a 可知,条带位置在 300 bp 左右,位置正确。将 3 个阳性菌落扩大培养后提取重组质粒,重组质粒提取结果如图 3b 所示。由图 3b 可知,条带位置在 10 000 bp 左右,位置正确。

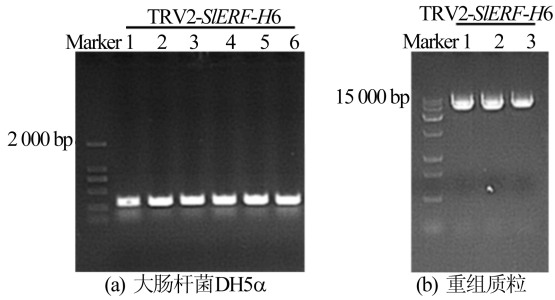
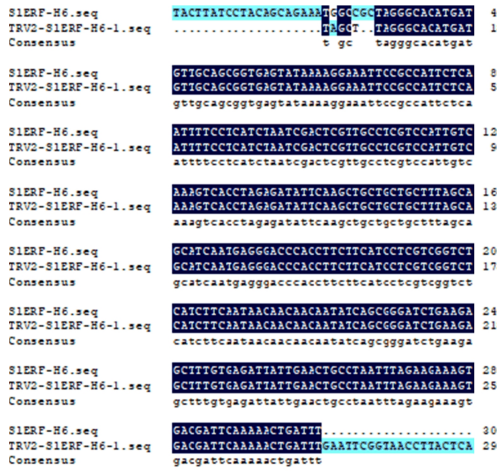


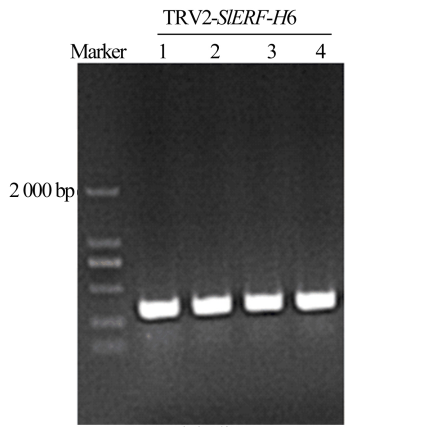
图 3 菌落 PCR 鉴定及重组质粒鉴定

2.2 序列比对及农杆菌转化分析

利用扩增引物对重组质粒进行测序,将测序结果与 *SlERF-H6* 的参考 CDS 进行比对,结果如图 4a 所示,比对结果显示均无碱基的替换与缺失,表明基因片段已经成功连接到 TRV2 载体上。将测序成功的重组 TRV2-*SlERF-H6* 质粒转化至农杆菌感受态细胞 GV3101 中,农杆菌菌落 PCR 鉴定结果如图 4b 所示,由图 4b 可知,条带位置在 300 bp 左右,位置正确,表明转化成功。将阳性单克隆扩大培养并于 -80 °C 冰箱保存菌种,用于后续侵染实验。



(a) 序列比对



(b) 农杆菌 GV3101

图 4 序列比对及菌落 PCR 鉴定

3 结 论

果实成熟过程中果肉的质地、颜色和香气等发生巨大的变化。根据果实成熟过程中乙烯的干预作用,果实可分为两大类:成熟初期呼吸迅速增加、乙烯生物合成激增的跃变型果实;呼吸和乙烯生物合成均没有显著增加的非跃变型果实。番茄属于跃变型果实。乙烯在果实成熟过程中起着关键的调节作用<sup>[11-13]</sup>。

ERF 能够与乙烯调控基因启动子区域的相关顺式作用元件结合,介导乙烯相关基因的表达,进而参与调控果实成熟。番茄中有 146 个 AP2/ERF 转录因子<sup>[14]</sup>,其中:18 个 ERF 转录因子属于 AP2 亚家族;48 个属于 DREB 亚家族;77 个属于 ERF 亚家族;3 个属于 RAV 亚家族。*SlERF-H6* 基因属于 ERF 亚家族的成员。*SlERF-H6* 在成熟过程中显著下调,在根、叶、花和未成熟果实中的表达量较高<sup>[14]</sup>。表明 *SlERF-H6* 可能在果实成熟过程中发挥调控作用,但其具体功能有待进一步研究。

本文利用同源重组技术成功构建了番茄乙烯响应因子 *SlERF-H6* 基因沉默载体,并转化农杆菌,为下一步转化番茄果实以及探究基因 *SlERF-H6* 在果实成熟中的调控功能提供参考。

参 考 文 献

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,1978:137-140.

[2] 蔡健,王薇,宋华. 番茄的营养保健作用及保藏技术[J]. 食品研究与开发,2005,26(3):137-138.

[3] OKAMURO J K, CASTER B, VILLARROEL R, et al. The AP2 domain of APETALA2 defines a large new family of DNA binding proteins in *Arabidopsis*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94(13):7076-7081.

[4] RIECHMANN J L, MEYEROWITZ E M. The AP2/EREBP family of plant transcription factors[J]. Biological Chemistry, 1998, 379(6):633-646.

[5] ALLEN M D, YAMASAKI K, OHMETAKAGI M, et al. A novel mode of DNA recognition by a beta-sheet revealed by the solution structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA[J]. The EMBO Journal, 1998, 17(18):5484-5496.

[6] EL-SHARKAWY I, KIM W S, EL-KEREMY A, et al. Isolation and characterization of four ethylene signal transduction elements in plums(*Prunus salicina* L.)[J]. Journal of Experimental Botany, 2007, 58(13):3631-3643.

(下转第 1242 页)

- and its potential mechanisms[J]. *Molecular Immunology*, 2013, 53(4): 421-430.
- [4] KERI R A, HO S M, HUNT P A, et al. An evaluation of evidence for the carcinogenic activity of bisphenol A[J]. *Reproductive Toxicology*, 2007, 24(2): 240-252.
- [5] RANCIERE F, LYONS J G, LOH V H Y, et al. Bisphenol A and the risk of cardiometabolic disorders: a systematic review with meta-analysis of the epidemiological evidence[J]. *Environmental Health*, 2015, 14(46): 1-23.
- [6] CHEN D, KANNAN K, TAN H, et al. Bisphenol analogues other than BPA: environmental occurrence, human exposure, and toxicity—a review[J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(11): 5438-5453.
- [7] LIAO C Y, LIU F, YING G, et al. Occurrence of eight bisphenol analogues in indoor dust from the united states and several asian countries: implications for human exposure[J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(16): 9138-9145.
- [8] YANG Y, LU L, ZHANG J, et al. Simultaneous determination of seven bisphenols in environmental water and solid samples by liquid chromatography: electrospray tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2014, 1328: 26-34.
- [9] LI A J, ZHANG T F, SHI W, et al. Serum concentration of bisphenol analogues in pregnant women in China[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 707: 1-7.
- [10] DUALDE P, PARDO O, CORPAS-BURGOS F, et al. Bio-monitoring of bisphenols A, F, S in human milk and probabilistic risk assessment for breastfed infants[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 668(10): 797-805.
- [11] ZHOU X L, KRAMER J P, CALAFAT A M, et al. Automated on-line column-switching high performance liquid chromatography isotope dilution tandem mass spectrometry method for the quantification of bisphenol A, bisphenol F, bisphenol S, and 11 other phenols in urine[J]. *Journal of Chromatography B*, 2014, 944: 152-156.
- [12] ELADAK S, GRISIN T, MOISON D, et al. A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound[J]. *Fertility and Sterility*, 2015, 103(1): 11-21.
- [13] SISK C L, ZEHR J L. Pubertal hormones organize the adolescent brain and behavior[J]. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 2005, 26(3/4): 163-174.
- [14] XU X H, HONG X, XIE L D, et al. Gestational and lactational exposure to bisphenol-A affects anxiety-and depression-like behaviors in mice[J]. *Hormones & Behavior*, 2012, 62(4): 480-490.
- [15] WEINSTEIN S D, VILLAFANE J J, JULIANO N, et al. Adolescent exposure to Bisphenol-A increases anxiety and sucrose preference but impairs spatial memory in rats independent of sex[J]. *Brain Research*, 2013, 1529(13): 56-65.
- [16] XU X H, DONG F N, YANG Y L, et al. Sex-specific effects of long-term exposure to bisphenol-A on anxiety-and depression-like behaviors in adult mice[J]. *Chemosphere*, 2015, 120: 258-266.
- [17] MOREMAN J, LEE O, TRZNADEL M, et al. Acute toxicity, teratogenic, and estrogenic effects of bisphenol A and its alternative replacements bisphenol S, bisphenol F, and bisphenol AF in zebrafish embryo[J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(21): 12796-12805.
- [18] LEFOL V, AIT-AISSA S, SONAVANE M, et al. *In vitro* and *in vivo* estrogenic activity of BPA, BPF and BPS in zebrafish-specific assays[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2017, 142(8): 150-156.

(责任编辑 闫杏丽)

## (上接第 1235 页)

- [7] CHUNG M Y, VREBALOV J, ALBA R, et al. A tomato (*Solanum lycopersicum*) *APETALA2/ERF* gene, *SlAP2a*, is a negative regulator of fruit ripening[J]. *The Plant Journal*, 2010, 64(6): 936-947.
- [8] FU C C, HAN Y C, QI X Y, et al. Papaya *CpERF9* acts as a transcriptional repressor of cell-wall-modifying genes *Cp-PME1/2* and *CpPG5* involved in fruit ripening[J]. *Plant Cell Reports*, 2016, 35(11): 2341-2352.
- [9] LI T, JIANG Z, ZHANG L, et al. Apple (*Malus domestica*) *MdERF2* negatively affects ethylene biosynthesis during fruit ripening by suppressing *MdACS1* transcription[J]. *The Plant Journal*, 2016, 88(5): 735-748.
- [10] ZHOU H, ZHAO L, YANG Q, et al. Identification of *EIL* and *ERF* genes related to fruit ripening in peach[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(8): 2846-2861.
- [11] GIOVANNONI J. Molecular biology of fruit maturation and ripening[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2001, 52: 725-749.
- [12] GIOVANNONI J J. Fruit ripening mutants yield insights into ripening control[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2007, 10(3): 283-289.
- [13] SEYMOUR G B, STERGAARD L, CHAPMAN N H, et al. Fruit development and ripening[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2013, 64: 219-241.
- [14] PIRRELLO J, PRASAD B C, ZHANG W, et al. Functional analysis and binding affinity of tomato ethylene response factors provide insight on the molecular bases of plant differential responses to ethylene[J]. *BMC Plant Biology*, 2012, 12: 190-204.

(责任编辑 闫杏丽)