

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2025.10.013

# 番茄 *SIBLI2* 基因 VIGS 载体的构建及其功能研究

肖钰薇, 张华, 汪文杰, 赵维升, 姚改芳, 胡康棣

(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。BLISTER(BLI)蛋白是许多应激反应的调节因子,可以促进植物对环境的适应性,在调控植物成熟方面发挥了重要作用。文章以番茄的 *SIBLI2*(Solyc12g097070.3)基因为研究对象,对 BLI 家族的基因序列特征进行分析。通过 *SIBLI2* 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 *SIBLI2* 病毒诱导的基因沉默(virus-induced gene silencing, VIGS)载体。文章利用基因沉默实验对番茄果实注射不同杆菌,发现 *SIBLI2* 具有抑制果实成熟功能,为进一步探究番茄 *SIBLI2* 基因在果实成熟中的作用提供参考。

**关键词:** 番茄; VIGS 载体; *SIBLI2* 基因; 同源重组; 成熟衰老

**中图分类号:** Q943.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-5060(2025)10-1383-06

## Construction and function of VIGS vector of *SIBLI2* gene in tomato

XIAO Yuwei, ZHANG Hua, WANG Wenjie,

ZHAO Weisheng, YAO Gaifang, HU Kangdi

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

**Abstract:** Tomato (*Solanum lycopersicum*) has high nutritional value and is popular among consumers. Currently, tomato has become one of the widely grown cash crops. The BLISTER (BLI) protein is a regulator of many stress responses, which promotes plant adaptation to the environment and plays an important role in regulating plant maturation. In this paper, the *SIBLI2* (Solyc12g097070.3) gene of tomato was used to analyze the sequence characteristics of the BLI family genes. By finding the specific region silencing sequence of the *SIBLI2* gene, a tomato *SIBLI2* virus-induced gene silencing (VIGS) vector was successfully constructed using homologous recombination technology. The tomato fruits were injected with different bacteria using gene silencing assay, and *SIBLI2* was found to have a function in inhibiting fruit ripening, providing a reference for further investigation into the role of the tomato *SIBLI2* gene in fruit ripening.

**Key words:** tomato (*Solanum lycopersicum*); virus-induced gene silencing (VIGS) vector; *SIBLI2* gene; homologous recombination; ripening and senescence

番茄 (*Solanum lycopersicum*) 属茄科, 是一种一年生或多年生草本植物。番茄原产自南美洲, 在中国南北方广泛栽培<sup>[1]</sup>, 是在世界范围内广泛种植的食用蔬菜水果<sup>[2]</sup>。目前世界上的番茄种植面积为 500 万公顷, 平均每平方米产量可达 3.7 kg。作为番茄种植面积最广、年产量最高的

国家, 目前我国年产总量高达  $5\ 500 \times 10^4$  t, 在所有蔬菜产量中占比约 7%<sup>[3]</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>[4]</sup>, 番茄果实酸甜可口、食用方便, 因此深受消费者的喜爱。

番茄果实的成熟过程会发生复杂的生理生化

收稿日期: 2023-06-27; 修回日期: 2023-08-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31970312; 31970200; 32170315; 32272682)

作者简介: 肖钰薇 (1998—), 女, 广东韶关人, 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: hzhanglab@hfut.edu.cn.

变化<sup>[5]</sup>,这些过程与果实的各种表型变化相吻合。其中,最易观察的变化就是果实颜色的改变,色素变化是果实成熟进程的重要标志。在果实成熟的过程中许多必要反应及重要分解代谢<sup>[6]</sup>的发生会导致叶绿素含量下降。随着果实的成熟,叶绿素含量开始减少,此时果实对营养物质的利用率提高,促进维生素的生物合成,与之相反的是类胡萝卜素和番茄红素开始在果实内积累、含量升高。因此,可通过观察番茄果实的颜色变化及检测番茄果实中色素含量变化判断果实的成熟进程。番茄是茄科植物基因组学研究的参考物种<sup>[7]</sup>,也是研究果实成熟发育的模式植物。BLISTER(BLI)蛋白是一种重要调节因子,通过对多种重要应激反应的调节可以提高植物的抗逆性<sup>[8]</sup>。

研究表明:BLISTER 蛋白在植物进化过程中高度保守,与许多物种中的序列高度类似<sup>[9]</sup>;BLI 蛋白的某段氨基酸序列产物可参与染色体浓缩和 DNA 修复等染色质反应<sup>[9]</sup>;而其 N 末端蛋白序列可起到定位和信息交流的功能,同时还是蛋白质的结合位点<sup>[10]</sup>。BLI 对植物在发育成熟中起重要作用,BLI 缺失会影响植物的正常发育,与同时期野生型植株相比,其种子、叶和花的生长均受到影响,出现植株个体小、发育缓慢、种子萌发率低、成活率不高的现象。BLISTER 蛋白在番茄果实发育成熟中报道较少,其在果实成熟发育过程中功能尚不明确。本文利用同源重组技术构建番茄 TRV2-*SIBLI2* 基因沉默载体,并成功转化农杆菌,利用果柄注射的方式探究其对果实成熟进程的影响。为进一步研究 *SIBLI2* 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 植物材料及菌株

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。

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 冰箱保存。

#### 1.1.2 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)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 *BamH* I 均购于 NEB 公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 BLI 家族生物信息学分析

首先,需要获得番茄 *BLI2*(Solyc12g097070.3)基因的序列信息,在 Sol Genomics Network 网站上获取番茄 *BLI2* 基因蛋白序列,并搜索拟南芥、草莓、水稻、番茄等物种的同源性高且 *E* 值低于 10~20 的基因序列,下载对应的蛋白质序列后利用 MEGA7.0 软件构建 BLI 家族系统进化树。通过利用 MEME (<https://meme-suite.org/meme/doc/meme.html>) 网站对 BLI 家族进行 motif 分析,利用 NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) 网站对其进行 Domain 分析。

### 1.2.2 总 RNA 的提取与 cDNA 的合成

利用 RNA prep 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。

### 1.2.3 引物设计与目的片段扩增、纯化

在 Sol Genomics Network (<https://vigs.solgenomics.net/>) 网站的 SGN VIGS Tool 中输入 *SIBLI2* 的编码序列(coding sequence, CDS),获得番茄 *SIBLI2* 基因大小约为 400 bp 的最佳沉默序列;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、下游酶切位点分别是 *EcoR* I 和 *BamH* 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>SIBLI2</i> -F	CGTGAGCTCGGTACCGGATCCGTGAACACACAAGAATCACTGACTCTC
<i>SIBLI2</i> -R	GTGAGTAAGGTTACCGAATTCGAATGACTAGTATTAATCCAAATCCAAT

采用 Phanta<sup>®</sup> Super-Fidelity DNA Polymerase 扩增目的片段,进行聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR),反应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。

#### 1.2.4 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。

#### 1.2.5 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-*SIBLI2*,将重组产物转化至感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中,具体的方法步骤参照说明书。

#### 1.2.6 重组质粒的获取及农杆菌转化

重组产物 TRV2-*SIBLI2* 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(含 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。

将测序比对正确的 TRV2-*SIBLI2* 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 LB 液体培养基(含 15  $\mu$ L 10 mg/mL 的卡那霉素和 15  $\mu$ L 10 mg/mL 的利福平)中,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。

#### 1.2.7 番茄果实的基因沉默实验

在固体 LB 培养基(50 g/mL Kana, 50 g/mL Gent, 50 g/mL Rif) 上活化用于侵染的 TRV1、TRV2、TRV2-*BLI2* 农杆菌。首次,摇菌从平板上挑取农杆菌单菌落,于含有相应抗生素的液体 LB 培养基(50  $\mu$ g/mL Kana, 50  $\mu$ g/mL Gent, 50  $\mu$ g/mL Rif) 中培养,28  $^{\circ}$ C、200 r/min 恒温摇床中培养 12 h; 第 2 次,摇菌转接第 1 次的菌液于液体 LB 培养基(50  $\mu$ g/mL Kana, 50  $\mu$ g/mL

Gent, 50  $\mu$ g/mL Rif, 10 mmol/L 2-吗啉乙磺酸(MES)、20  $\mu$ mol/L 丙酮)中培养 12 h; 5 000 r/min 室温离心 3 min, 使用侵染液(10 mmol/L MES、10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、200  $\mu$ mol/L 丙酮, pH 值 5.6)重悬菌体使其处于 OD<sub>600</sub> 为 3.0~4.0。

使用无菌注射器针头在番茄果柄上轻轻刮出伤口,将 50  $\mu$ L 侵染液滴在伤口处,将侵染后的番茄植株于暗处培养 16 h,然后变为 16 h/8 h 光暗交替培养。拍照记录表型并及时取样于 -80  $^{\circ}$ C 冰箱保存。

#### 1.2.8 样品含色素量的测定

样品中类胡萝卜素、叶绿素的量根据文献[11]方法测定。取 1 g 番茄果实,用液氮研磨成粉末,使用 96% 乙醇提取果实中的类胡萝卜素和叶绿素,检测上清液的波长为 470、649、665 nm。样品中叶绿素和类胡萝卜素的量以 mg/g 鲜重(FW) 表示。

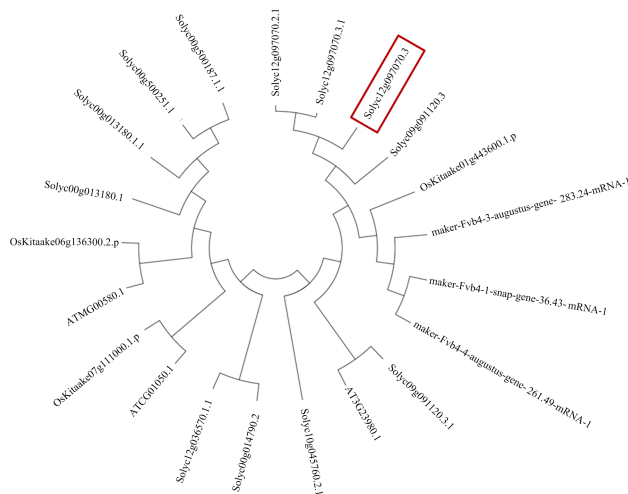
## 2 结果与分析

### 2.1 BLI 家族生物信息学分析

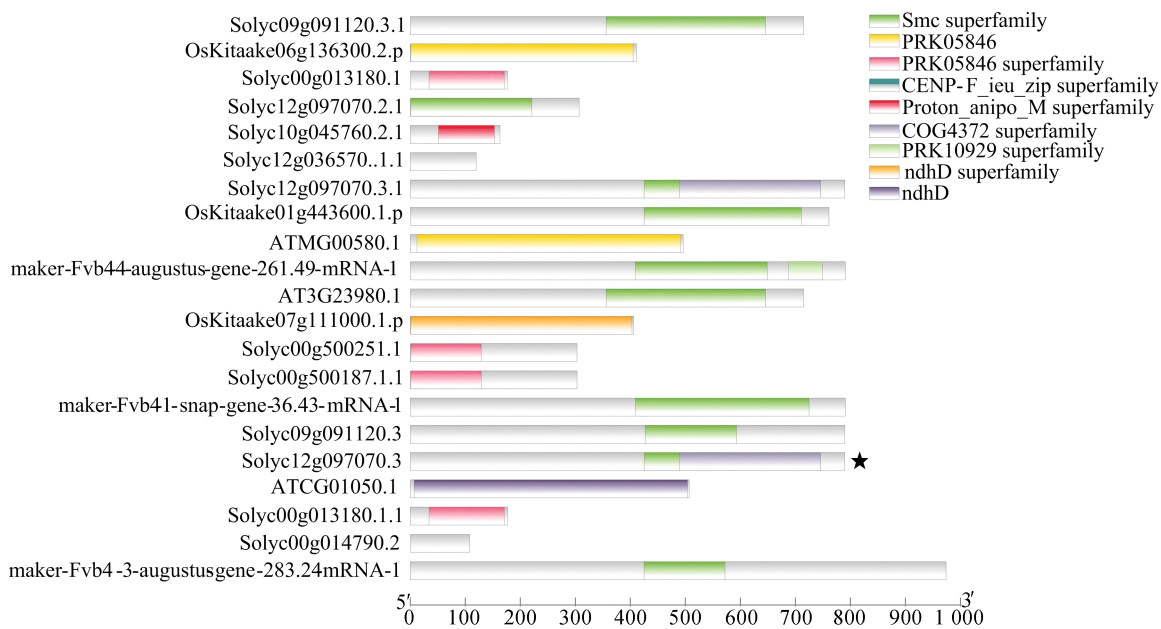
#### 2.1.1 *BLI* 基因的系统进化树分析

将下载的番茄 *BLI2* 及其 Blast 的蛋白序列构建系统进化树,结果如图 1a 所示。从图 1a 可以看出,在同一物种番茄中, *SIBLI2* (Solyc12g097070.3) 与番茄的 Solyc09g091120.3、Solyc12g097070.3.1、Solyc12g097070.2.1 在进化树的同一分支上,说明它们有较高的同源性,猜测它们或许会有相近的功能。

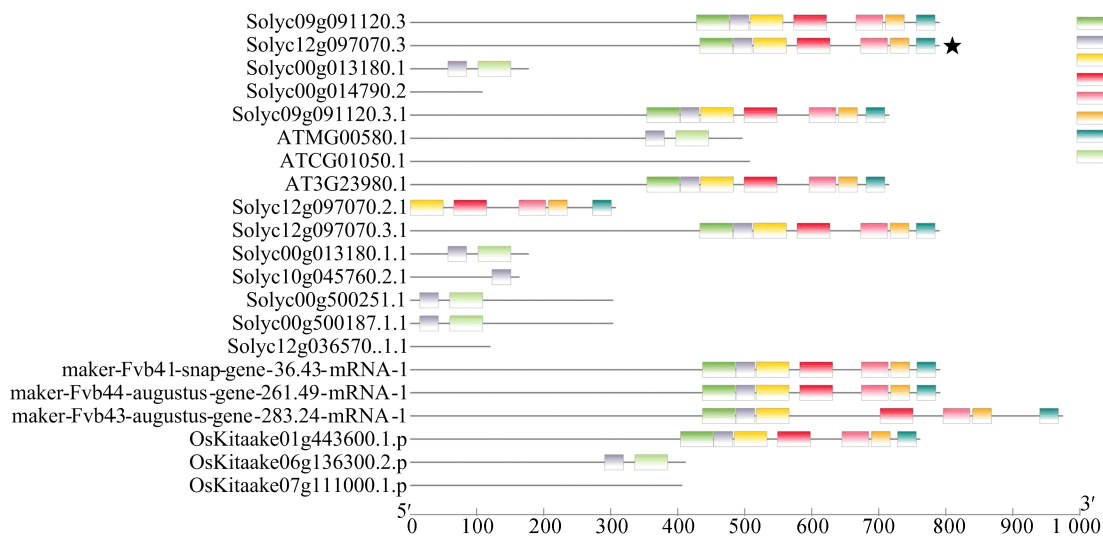
利用进化树得到与 *SIBLI2* 同一分支上的蛋白后,使用 TBtools 工具对它们的结构域进行分析,以进一步分析 *SIBLI2* 的功能,结果如图 1b 所示。由图 1b 可知, *SIBLI2* (Solyc12g097070.3) 与 Solyc09g091120.3、maker-Fvb4-1-snap-gene-36.43-mRNA-1、maker-Fvb4-4-augustus-gene-261.49-mRNA-1、OsKitaake01g443600.1.p 都具有 Smc 基序,且所在位置相近,在进化上相对保守,与系统进化树分析结果相同。利用 MEME 网站对 *SIBLI2* 基因及其进化树同一分支上的基因进行 Motif 分析,结果如图 1c 所示。从图 1c 可以看出, Solyc12g097070.3、Solyc09g091120.3、maker-Fvb4-1-snap-gene-36.43-mRNA-1、maker-Fvb4-4-augustus-gene-261.49-mRNA-1、OsKitaake01g443600.1.p 均存在至少 1 个相同的 Motif 基序,且所处位置相同。因此,判断这 5 个蛋白在进化上较为保守、在功能上相似,与进化树分析及保守结构域分析结果相同。



(a) BLI家族基因系统进化树



(b) BLI相关基因Domain分析



(c) BLI相关基因Motif分析

图 1 BLI 家族基因生物信息学分析

### 2.2 TRV2-*SIBLI2* 载体的构建及农杆菌转化

使用 Prime Script™ RT Master Mix 试剂盒反转录获得 cDNA。以 cDNA 为模板克隆得到了 *SIBLI2* 的片段,如图 2a 所示,其中 M 表示 DNA Marker。从图 2a 可以看出,目的序列长度为 400 bp,条带位置与预期一致,表明 *SIBLI2* 基因克隆成功。

片段纯化后进行琼脂糖凝胶电泳检测,纯化结果如图 2b 所示,可以看出,纯化后无杂带,可进行下一步实验。

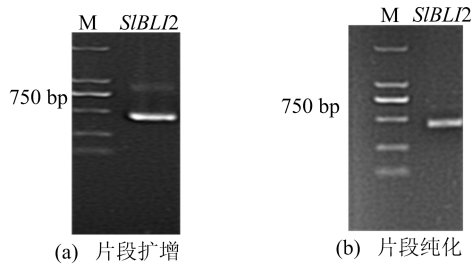


图 2 TRV2-*SIBLI2* 片段的扩增和纯化

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 DH5α 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 3 所示。图 3 中:M 表示 DNA Marker;泳道 1~泳道 7 表示单克隆菌落鉴定结果。由图 3 可知,条带位置在 400 bp 左右,位置正确。

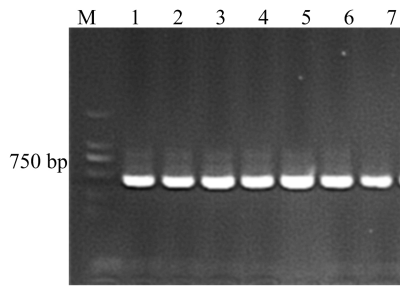


图 3 TRV2-*SIBLI2* 大肠杆菌阳性克隆鉴定

挑选 3 个阳性菌落扩大培养后提取重组质粒,利用扩增引物对重组质粒进行测序,将测序结果与 *SIBLI2* 的参考 CDS 序列进行比对,结果如图 4 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-*SIBLI2* 质粒转化至农杆菌感受态细胞 GV3101 中,将阳性单克隆扩大培养并于一 80 °C 冰箱保存菌种,用于后续侵染实验。

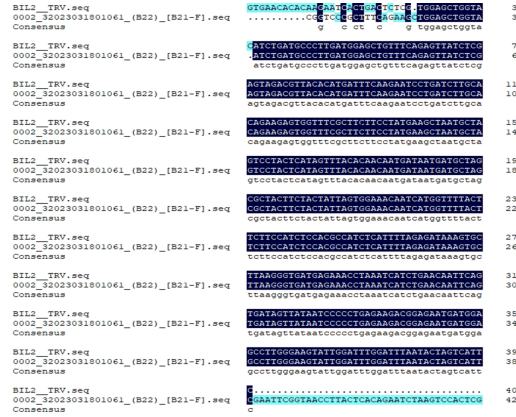


图 4 TRV2-*SIBLI2* 测序结果

### 2.3 *SIBLI2* 基因沉默植株的构建

为探究 *SIBLI2* 在果实成熟衰老过程中的功能,利用 VIGS 技术构建 *SIBLI2* 基因沉默植株。选取生长状况良好的野生型 (WT) 番茄植株,并选择花后 15 d 生长状况一致的 WT 番茄果实进行果柄侵染,记录 TRV1 + TRV2 (对照组) 和 TRV1 + TRV2-*SIBLI2* (实验组) 侵染番茄果实 10、20、25 d 的表型,如图 5 所示。由图 5 可知:对照组在侵染后的 20 d 开始破色,实验组的 *SIBLI2*-vigs 已经破色完成,即将进入红熟期;在侵染后 25 d,对照组已经完成破色,开始进入红熟期,而实验组的 *SIBLI2*-vigs 已完全成熟。

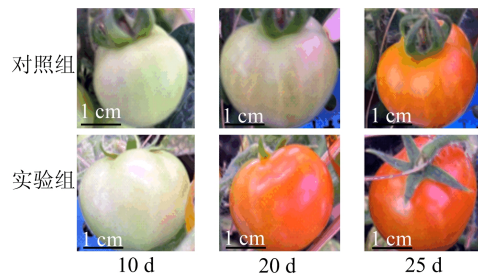


图 5 *SIBLI2* 沉默番茄果实表型

摘取注射后 20、25 d 的番茄,检测对照组和实验组番茄果实中含色素量的变化,如图 6 所示。其中:数据为 3 个生物学重复的平均值±标准差; \* 表示  $P < 0.05$ , \*\* 表示  $P < 0.01$ 。由图 6 可知:对照组果实中叶绿素 a 的量均高于实验组,尤其注射后 20 d,对照组果实中叶绿素 a 的量约为实验组的 2 倍;注射后 2 个时间点,对照组果实中叶绿素 b 的量都高于实验组;注射后 20 d 对照组总叶绿素的量与实验组的相差较大,对照组约为实验组的 1.5 倍,表明 TRV2-*SIBLI2* 番茄相比对照组番茄含有较少的叶绿素;注射后 20 d, *SIBLI2* 沉默番茄含有较高的类胡萝卜素量,约为对照组番茄的 1.5 倍,注射后 25 d,实验组果实中

类胡萝卜素的量约为对照组的 1.8 倍,表明 *SIB-LI2* 沉默加快了番茄类胡萝卜素的合成。

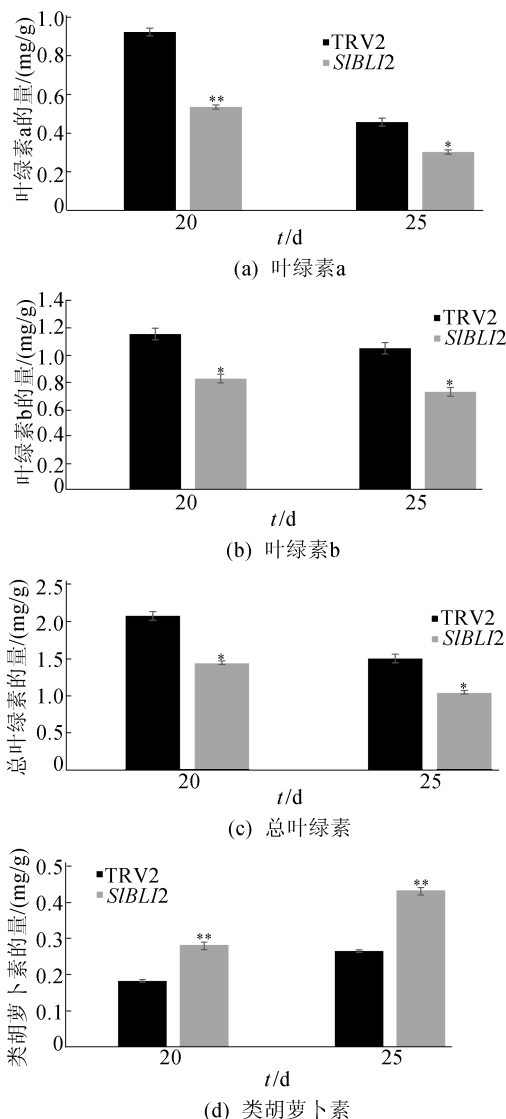


图 6 TRV2-*SIBLI2* 番茄果实中含色素量的变化

### 3 讨 论

研究表明,果实成熟过程涉及一系列生理生化变化,包括色素积累、果实软化、香气和风味物质形成等,也是果实品质形成的过程<sup>[12]</sup>。随着果实的发育成熟,含叶绿素量开始减少,此时果实对营养物质的利用率提高,促进维生素的生物合成。与之相反,类胡萝卜素和番茄红素开始在果实内积累、含量升高。因此,番茄果实的颜色变化及含色素量变化可反映果实的成熟进程。通过生物信息学分析可知,*SIBLI2* (Solyc12g097070.3) 与番茄的 Solyc09g091120.3、Solyc09g091120.3.1、Solyc09g091120.3 和草莓的 maker-Fvb4-1-snap-gene-36.43-mRNA-1、maker-Fvb4-4-augustus-gene-

261.49-mRNA-1 同源性较高,蛋白较保守,判断它们可能有相同的功能性,且该功能可能在成熟进程中发挥重要作用。因此,在进化的过程中较为保守。

本文利用同源重组技术成功构建了 *SIBLI2* 基因沉默载体,并转化农杆菌;利用 TRV2-*SIB-LI2* 基因沉默载体进行病毒诱导的基因沉默实验。通过对比注射重组质粒农杆菌与空载质粒农杆菌的同种植株,发现沉默 *SIBLI2* 基因的植株成熟速度明显大于对照组,说明 *SIBLI2* 基因对番茄果实的成熟起到抑制作用,为其在果实成熟过程中的生理功能提供新的参考。

### [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] 赵洪,邓姗,章毅颖,等. 2009—2018 年我国番茄品种利用及管理分析[J]. 江苏农业科学,2020,48(12):24-28.
- [3] 李建鑫,王文平,胡璋健,等. 模拟酸雨对番茄光合作用和病害发生的影响及油菜素内酯对其缓解效应[J]. 中国农业科学,2021,54(8):1728-1738.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] GUO Y,GAN S. Leaf senescence: signals, execution, and regulation[J]. Curr Top Dev Biol,2005,71:83-112.
- [7] 王娟. 番茄基因组研究进展[J]. 新疆农业科学,2019,56(2):10.
- [8] ZIMMERMANN P,HEINLEIN C,ORENDI G et al. Senescence-specific regulation of catalases in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh [J]. Plant Cell Environ,2006,29(6):1049-106.
- [9] SCHUBERT V. SMC Proteins and their multiple functions in higher plants[J]. Genome Research,2009,124:202-214.
- [10] NICOLE S,YVONNE S,MAREIKE L. H, et al. The CURLY LEAF interacting protein BLISTER controls expression of polycomb-group target genes and cellular differentiation of *Arabidopsis thaliana* [J]. The Plant Cell,2010,22(7):2291-2305.
- [11] 张晓玥. 半胱氨酸脱羧酶 LCD 在番茄果实成熟衰老进程中的调控机制研究[D]. 合肥:合肥工业大学,2020.
- [12] HU S,LIU L,LI S, et al. Regulation of fruit ripening by the brassinosteroid biosynthetic gene *SICYP90B3* via an ethylene-dependent pathway in tomato [J]. Horticulture Res,2020,7:163.

(责任编辑 闫杏丽)