

刘 爽. 2 个不同番茄品系 *fasciated* 基因克隆及表达载体构建[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(20): 21–24.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.20.005

## 2 个不同番茄品系 *fasciated* 基因克隆及表达载体构建

刘 爽

(福建农林大学园艺学院, 福建福州 350002)

**摘要:** 为了比较由笔者所在实验室通过多代自交筛选得到的性状稳定的 2 个番茄品系 FL1、MLK1 中 *fasciated* 基因的编码序列, 并验证该基因的功能, 通过特异性引物 PCR, 获得该基因在 2 个供试材料中的序列, 并通过 Gateway 技术分别构建了该基因的超量表达载体和 RNAi 载体。序列比对结果表明, 2 个心室差异明显的番茄材料中该基因的编码序列完全一致, 同时也构建了完整的质粒表达载体系统。供试番茄材料中心室数的不同并不是由 *fasciated* 编码序列的差异引起的。Gateway 技术是一种快速高效的植物表达载体构建方法。

**关键词:** 番茄; 心室; *fasciated*; 载体构建; Gateway

**中图分类号:** S641.201 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)20-0021-04

20 世纪以来, 我国番茄生产中畸形果发生率高达 20% 以上, 特别是冬春季节温室番茄生产中畸形果发生率更高。在大果型番茄品种中, 每一花序最先开的花畸形果发生最多, 以第一花序畸形果发生率最高, 这严重影响番茄的食用品质, 且果实畸形, 外观品质欠佳, 亦影响销售, 在生产中造成严重的经济损失<sup>[1]</sup>。因此, 许多科技工作者就如何减少番茄畸形果的发生进行了一系列的研究, 目前已经明确了番茄心室数是产生畸形果的主要原因, 即心室数越多, 果实越大, 越易产生畸形果; 而随着心室数的减少, 果实逐渐变小, 畸形果亦降低<sup>[2-4]</sup>。番茄心室的形成既与其本身的遗传特性有关<sup>[2]</sup>, 又与植物生长调节物质、温度、光照、营养等条件有关, 各种外界环境均是通过影响番茄本身的遗传基因的表达而对番茄心室形成起作用的<sup>[3-5]</sup>。

2008 年 Cong 等利用图位克隆的方法成功获得 *fasciated* 基因, 该基因通过碱基突变或转录水平的变化控制番茄心室的形成, 并经过转基因技术验证, 确认是主要的控制番茄心室形成的基因<sup>[6]</sup>。本试验中的 2 个供试番茄品系是经过多代自交已完全纯合的材料, 分别命名为多心室 MLK1 和少心室

FL1 番茄, 心室数差异明显, 但 *fasciated* 的序列未知。为了明确该基因在 2 个供试材料中的序列差异, 明确供试番茄材料的心室数差异是否由 *fasciated* 序列差异或是转录水平差异引起, 同时为了进一步通过该基因的过表达和沉默植株研究其调控机理, 进行了本试验。

### 1 材料与方法

#### 1.1 植物材料、菌种和质粒

1.1.1 植物材料 试验材料: 少心室番茄品系 FL1 (心室 2~3 个), 多心室番茄品系 MLK1 (心室 15 个左右), 由笔者所在实验室经多代自交获得, 二者心室数及果实大小差异明显。

1.1.2 入门克隆载体 pENTR/D-TOPO<sup>®</sup>、卡那霉素抗性、pCR<sup>®</sup> 8/GW/TOPO<sup>®</sup>、壮观霉素抗性, 统一购自美国英杰 (Invitrogen) 生命技术有限公司。

1.1.3 植物表达载体 pMDC141 (超量表达载体) 和 pB7GWIWG2 (I) (RNAi 载体), 分别以抗潮霉素 *hyg* 基因和抗除草剂 *bar* 基因作为筛选标记, 2 个载体均由笔者所在实验室保存备用。

1.1.4 菌种 pGEM-T 载体及大肠杆菌 *Escherichia coli* 感受态细胞购自北京天根生化科技有限公司。

1.1.5 主要试剂 琼脂糖凝胶回收试剂盒及质粒小提试剂盒、Gateway LR Clonase Enzyme Mix II 购自 Invitrogen 公司。限制性内切酶、*rTaq* DNA 聚合酶、LA *Taq* DNA 聚合酶以及

Biochemistry, 2002, 269(13): 3113–3121.

[8] Seymour S L, Klinman J P. Comparison of rates and kinetic isotop effects using PEG-modified variants and glycoforms of glucose oxidase; the relationship of modification of the protein envelope to C—H activation and tunneling[J]. Biochemistry, 2002, 41(27): 8747–8758.

[9] Cioci F, Lavecchia R. Effects of polyols and sugars on heat-induced flavin dissociation in glucose oxidase[J]. Biochemistry & Molecular Biology International, 1994, 34(4): 705–712.

[10] Holland J T, Harper J C, Dolan P L, et al. Rational design of glucose oxidase for improved catalytic function and stability[J]. PLoS One, 2012, 7(6): e37924.

收稿日期: 2018-01-10

基金项目: 福建省自然科学基金面上项目 (编号: 2015J01609)。

作者简介: 刘 爽 (1983—), 女, 辽宁桓仁人, 博士, 讲师, 从事设施蔬菜栽培生理与生物技术研究。E-mail: liushuangsyau@aliyun.com。

[4] Ferri S, Kojima K, Sode K. Review of glucose oxidases and glucose dehydrogenases: a bird's eye view of glucose sensing enzymes[J]. Journal of Diabetes Science & Technology, 2011, 5(5): 1068–1076.

[5] Bentley R, Neuberger A. The mechanism of the action of notation [J]. Biochemical Journal, 1949, 45(5): 584–590.

[6] Keilin D, Hartree E F. The use of glucose oxidase for the determination of glucose in biological material and for the study of glucose-producing systems by manometric methods[J]. Biochemical Journal, 1948, 42(2): 230–238.

[7] Knapp M J, Klinman J P. Environmentally coupled hydrogen tunneling. Linking catalysis to dynamics [J]. European Journal

PrimerSTAR HS 聚合酶和 dNTP 购自大连宝生物工程有限公司。M - MLV RT 及 RNase 抑制剂购自普洛麦格 (Promega) 公司。其他常规试剂采用进口分装或国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 2 种不同番茄品系 FL1 和 MLK1 中 *fasciated* 的扩增  
根据 Genebank 中 *fasciated* 的序列 EU557674 (783 bp), 用 Primer 5.0 跨基因特异序列进行引物设计, 由 Invitrogen 公司合成。引物序列如表 1 所示。

提取幼嫩番茄叶片总 RNA, 经过逆转录 PCR 后用 *fas-f-1 fas-f-1'* 分别扩增 FL1、MLK1 番茄中的 *fasciated* 基因序列 (包括全部的编码序列), 切胶回收后连入 pENTR/D - TOPO® 载体中, 挑取单克隆, 由 Invitrogen 公司进行测序后, 进行序列比对。

表 1 本试验所使用的引物序列

引物名称	引物序列	片段长度 (bp)
<i>fas-f-1</i>	F:5'-TCCCCTTTCATCCATGTTCT-3' R:5'-CGCTATTGTTGCCCTCC-3'	551
<i>fas-f-1'</i>	F:5'-CACCTCCCTTTGATCCATGTTCT-3' R:5'-CGCTATTGTTGCCCTCC-3'	551

1.2.2 入门克隆建立及植物表达载体的构建 本试验采用 GATEWAY 技术构建植物表达载体。首先, 利用引物 *fas-f-1 fas-f-1'* 分别扩增 FL1、MLK1 番茄中的 *fasciated* 基因, 经过胶回收后将该片段分别连接到 pCR® 8/GW/TOPO® 和 pENTR/D - TOPO® 入门克隆载体中, 用通用引物 M13+ 测序验证序列及连入方向的正确, 通过 LR 反应将该基因片段最终置换到表达载体中, 再通过酶切及测序的方式验证正确后将其通过电转的方法转化到农杆菌感受态细胞中去, -80℃ 保存待用。

1.2.3 LR 克隆及热激法转化大肠杆菌 (1) 于室温添加 LR 克隆反应体系 (入门载体 (PENTR 质粒 DNA) 100 ng, 目的载体 (质粒 DNA) 150 ng, 加 ddH<sub>2</sub>O 至终体积 8 μL) 至 PCR 管内。(2) 将 LR Clonase II 置于冰上, 每个样品加 2 μL, 柔和混匀 (勿抽打) 后于 25℃ 反应 1~48 h。(3) 每个样品加 1 μL Proteinase K (蛋白酶 K), 柔和混匀 (勿抽打) 后于 37℃ 反应 10 min。(4) 取 2 μL LR 克隆反应物加入大肠杆菌 *E. coli* 感受态细胞, 置于冰上 5~30 min。(5) 42℃ 热击 90 s, 置于冰上 2~3 min, 加入 500 μL 无抗生素的 LB 液体培养基。(6) 37℃, 100~150 r/min 振荡培养 1 h。(7) 4 000 r/min 低速离心 1 min, 取 200 μL 涂布于含有 100 mg/L 表达载体抗性的 LB 平板, 37℃ 过夜培养。

2 结果与分析

2.1 2 个不同番茄品系 FL1 和 MLK1 中 *fasciated* 的扩增  
取两叶一心时期的多心室和少心室番茄茎尖生长点, 提取 RNA, 反转录为 cDNA, 用于 *fasciated* 扩增, 扩增的片段包括 *fasciated* 的全部编码序列 (34~567 bp), 长为 551 bp, 如图 1 所示。

2.2 2 个不同番茄品系 FL1 和 MLK1 中 *fasciated* 序列比对  
用 DNAMAN 进行序列比对, 结果如图 2 所示, 2 个不同番茄品系中 *fasciated* 基因的编码序列完全一致。

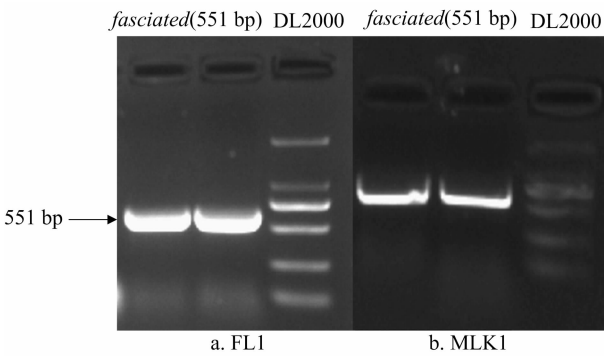


图 1 FL1 和 MLK1 番茄中的 *fasciated* 基因电泳

2.3 2 个不同番茄品系 FL1 和 MLK1 中 *fasciated* 表达载体构建的酶切检测

首先用特异性引物对 LR 反应的单克隆质粒 DNA 进行 PCR 检测, 初步验证 *fasciated* 片段整合进入目的载体。然后对 RNAi 载体通过限制性内切酶酶切验证 *fasciated* 片段整合的正确性, 特别是 RNAi 载体中的发夹结构。对超表达载体笔者直接进行了测序并进行序列的比对, 测出的序列中带有部分载体序列 (*attB* 序列), 以确保插入序列的完全正确性。

笔者选用了 3 种酶对构建的 RNAi 载体进行酶切验证, 分别是 *EcoR* I、*Hind* III、*Xba* I, 如图 3 - A 所示, 用 *EcoR* I、*Hind* III、*Xba* I 3 种酶切 LR 反应前的载体 pB7GWIWG2 分别能切出 3 237、3 180、2 167 bp 的片段; LR 反应之后的载体用 *Hind* III 酶切可以切出 196 bp 的片段以及另外 2 个大小的片段, 这 3 个片段总长为 2 148 bp, 因为本连入片段分别在 293、488 bp 有该酶的酶切位点, *Xba* I 可以切出 584 bp + *fas* (551 bp) 长度的片段, 而 *EcoR* I 酶切位点位于 *ccdB* 基因上, 因此 LR 反应后不能切出片段。

对于超表达载体的构建, 采用序列比对检测, 测序得到的序列中包括了完整的 PCR 产物片段 (551 bp), 并且测得 *attB2* 的互补序列, 说明载体构建准确无误, 可以用于下一步的试验 (图 4)。

2.4 2 个不同番茄品系 FL1 和 MLK1 中 *fasciated* 表达载体 PCR 检测

终载体的检测采用了质粒 PCR 的方法, 挑取多个单克隆, 以水和空载体质粒为对照进行 PCR, 结果如图 5 所示: 对照没有目的片段出现, 而选择的终载体质粒扩增出了目的片段, 说明载体已经构建成功。

3 讨论与结论

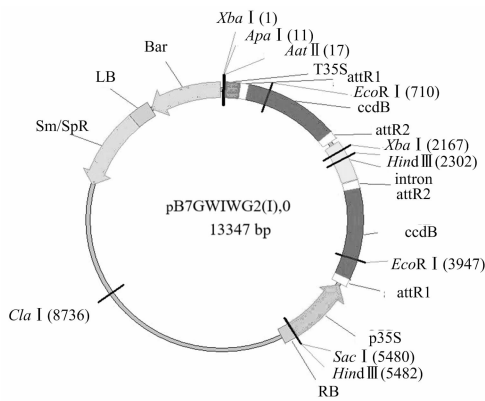
3.1 讨论

本试验经过扩增得到的 *fasciated* 基因序列与 Cong 等的研究结果一致, 说明该基因在相同作物中具有高度保守性, 在供试番茄材料的心室差异并不是由于二者的 cDNA 序列差异造成的; 同时也进行了 2 个供试材料 *fasciated* 基因 mRNA 转录水平的比较, 发现少心室番茄 FL1 比 MLK1 的转录水平差异显著<sup>[5]</sup>。在这一点上, 试验结果同 Cong 等是相同的<sup>[6]</sup>, 即在番茄心室数差异明显的番茄植株中, *fasciated* 转录水平差异明显。因此, 为了更深入地研究不同材料中 *fasciated* 基因的调控作用, 进行了该基因的过表达与 RNAi 表达载体的构建。

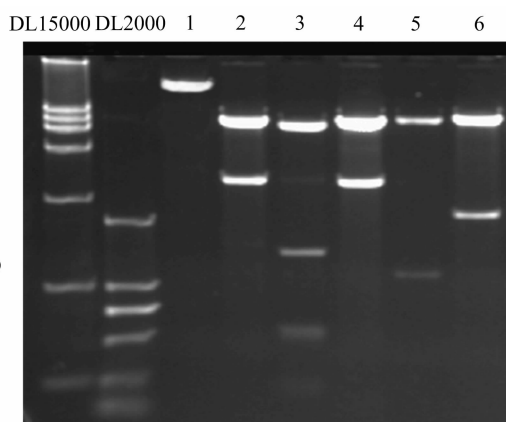
fas.txt	ACCTAAAAAATTAATTTATAAATATAAAATGTCAT	40	fas.txt	AAGCTGCAAAAGGCAACAGTACACAAATGTTGAAAATAATT	280
A08_1111170116_T	...GGATCTTAACAACTATTATTAATAATATAAAATGTCAT	37	A08_1111170116_T	AAGCTGCAAAAGGCAACAGTACACAAATGTTGAAAATAATT	277
A07_1111170115_T	...GGATCTTAACAACTATTATTAATAATATAAAATGTCAT	38	A07_1111170115_T	AAGCTGCAAAAGGCAACAGTACACAAATGTTGAAAATAATT	278
fas34-567.txt	.....ATGTCAT	7	fas34-567.txt	AAGCTGCAAAAGGCAACAGTACACAAATGTTGAAAATAATT	247
Consensus	atgtccat		Consensus	aagctgcaaaaggcaacagtcacacaaatgttgaataaatt	
fas.txt	TCGATATGACTTTTCTCTTCCACCTTCTCTCAGAACGGGT	80	fas.txt	CTAGTAATTATAAAGCTTATGGTTTCATCATCATCATCTCTC	320
A08_1111170116_T	TCGATATGACTTTTCTCTTCCACCTTCTCTCAGAACGGGT	77	A08_1111170116_T	CTAGTAATTATAAAGCTTATGGTTTCATCATCATCATCTCTC	317
A07_1111170115_T	TCGATATGACTTTTCTCTTCCACCTTCTCTCAGAACGGGT	78	A07_1111170115_T	CTAGTAATTATAAAGCTTATGGTTTCATCATCATCATCTCTC	318
fas34-567.txt	TCGATATGACTTTTCTCTTCCACCTTCTCTCAGAACGGGT	47	fas34-567.txt	CTAGTAATTATAAAGCTTATGGTTTCATCATCATCATCTCTC	287
Consensus	tctgatatgacttttctcttcttccacttctctcagaaacgggt		Consensus	ctagtaattataaagcttattggttctcatcatcatcatctctc	
fas.txt	TGTTACTTGCAATGTAATTTTGCACACCATCTCTGGCG	120	fas.txt	TTCAAAGTTCAACAGATATTCTTCCATTGTTCTCTCTCAA	360
A08_1111170116_T	TGTTACTTGCAATGTAATTTTGCACACCATCTCTGGCG	117	A08_1111170116_T	TTCAAAGTTCAACAGATATTCTTCCATTGTTCTCTCTCAA	357
A07_1111170115_T	TGTTACTTGCAATGTAATTTTGCACACCATCTCTGGCG	118	A07_1111170115_T	TTCAAAGTTCAACAGATATTCTTCCATTGTTCTCTCTCAA	358
fas34-567.txt	TGTTACTTGCAATGTAATTTTGCACACCATCTCTGGCG	87	fas34-567.txt	TTCAAAGTTCAACAGATATTCTTCCATTGTTCTCTCTCAA	327
Consensus	tgttacttgcaatgtaattttgcaacaccattcttggcg		Consensus	tccaagttccaacagatattcttccattggttctctctcaa	
fas.txt	GTTAGTGTTCATGCGACCAACATGTTAACCTTAGTGACAG	160	fas.txt	ATTGAACCTTAAATCCCTTCGATTTCGTCACCAAGAGAAAA	400
A08_1111170116_T	GTTAGTGTTCATGCGACCAACATGTTAACCTTAGTGACAG	157	A08_1111170116_T	ATTGAACCTTAAATCCCTTCGATTTCGTCACCAAGAGAAAA	397
A07_1111170115_T	GTTAGTGTTCATGCGACCAACATGTTAACCTTAGTGACAG	158	A07_1111170115_T	ATTGAACCTTAAATCCCTTCGATTTCGTCACCAAGAGAAAA	398
fas34-567.txt	GTTAGTGTTCATGCGACCAACATGTTAACCTTAGTGACAG	127	fas34-567.txt	ATTGAACCTTAAATCCCTTCGATTTCGTCACCAAGAGAAAA	367
Consensus	gtagtggttccatgacgacacatgtaacacctagtgacag		Consensus	attgaacctaaaatcccttcgatttcgctccaccagagaaaa	
fas.txt	TAAGATGTGGGCATTGTCGCAAAATATGCTTTCTGTTAATAT	200	fas.txt	GACAACGTTGCTTCTCTGCGTACAACCGATTTCATCAAGGA	440
A08_1111170116_T	TAAGATGTGGGCATTGTCGCAAAATATGCTTTCTGTTAATAT	197	A08_1111170116_T	GACAACGTTGCTTCTCTGCGTACAACCGATTTCATCAAGGA	437
A07_1111170115_T	TAAGATGTGGGCATTGTCGCAAAATATGCTTTCTGTTAATAT	198	A07_1111170115_T	GACAACGTTGCTTCTCTGCGTACAACCGATTTCATCAAGGA	438
fas34-567.txt	TAAGATGTGGGCATTGTCGCAAAATATGCTTTCTGTTAATAT	167	fas34-567.txt	GACAACGTTGCTTCTCTGCGTACAACCGATTTCATCAAGGA	407
Consensus	taagatgtgggcattgtgcaaatatgctttctgttaatat		Consensus	gacaacgtgttctcttctgctgacaacgattcatcaagga	
fas.txt	TGGATCTTTAATCAAGCTCTACCCCTTCAAGATGTTCAA	240	fas.txt	AGAGATTCAAAGGATCAAGGCCAGTAATCCTGATATTAGC	480
A08_1111170116_T	TGGATCTTTAATCAAGCTCTACCCCTTCAAGATGTTCAA	237	A08_1111170116_T	AGAGATTCAAAGGATCAAGGCCAGTAATCCTGATATTAGC	477
A07_1111170115_T	TGGATCTTTAATCAAGCTCTACCCCTTCAAGATGTTCAA	238	A07_1111170115_T	AGAGATTCAAAGGATCAAGGCCAGTAATCCTGATATTAGC	478
fas34-567.txt	TGGATCTTTAATCAAGCTCTACCCCTTCAAGATGTTCAA	207	fas34-567.txt	AGAGATTCAAAGGATCAAGGCCAGTAATCCTGATATTAGC	447
Consensus	tggatctttaatcaagctctaccccttcaagatgttccaa		Consensus	agagattcaaaggatcaaggccagtaatcctgatattagc	
fas.txt	CATCGTGAAGCTTTAGCACTGCTGCCAAAAAATGGGCGAC	520			
A08_1111170116_T	CATCGTGAAGCTTTAGCACTGCTGCCAAAAAATGGGCGAC	517			
A07_1111170115_T	CATCGTGAAGCTTTAGCACTGCTGCCAAAAAATGGGCGAC	518			
fas34-567.txt	CATCGTGAAGCTTTAGCACTGCTGCCAAAAAATGGGCGAC	487			
Consensus	catcggtgaagcttttagcactgctgccaaaaatgggcac				
fas.txt	ATTTTCCACATATTCACTTTGGACTCAAGCTGGAGGGCAA	560			
A08_1111170116_T	ATTTTCCACATATTCACTTTGGACTCAAGCTGGAGGGCAA	557			
A07_1111170115_T	ATTTTCCACATATTCACTTTGGACTCAAGCTGGAGGGCAA	558			
fas34-567.txt	ATTTTCCACATATTCACTTTGGACTCAAGCTGGAGGGCAA	527			
Consensus	attttccacatattcactttggactcaagctggaggccaa				
fas.txt	CAAATAGCGAGGGA.....AATAAACTTTAATAT	590			
A08_1111170116_T	CAAATAGCGAGGGA.....AATAAACTTTAATAT	597			
A07_1111170115_T	CAAATAGCGAGGGA.....AATAAACTTTAATAT	598			
fas34-567.txt	CAAATAG.....AATAAACTTTAATAT	534			
Consensus	caaatag				

Fas—整个 *fasciated* 基因 cDNA 序列; A08—FL1 *fasciated* 序列; A07—MLK1 *fasciated* 序列; *fas34-567*—*fasciated* 基因的编码序列

图2 FL1 和 MLK1 番茄中的 *fasciated* 编码序列比对



A. LR 反应前 pB7GWIWG2 载体



B. pB7GWIWG2 LR 反应前后酶切检测结果

1、3、5为 LR 反应后载体 pB7GWIWG2; 2、4、6为 LR 反应前载体酶切检测结果; 1、2为 *EcoR* I 酶切结果; 3、4为 *Hind* III 酶切结果; 5、6为 *Xba* I 酶切结果

图3 RNAi 载体酶切检测

对于植物表达载体的构建,采用了 Gateway 技术,该技术可以高效、准确地构建表达载体,操作简便,反应条件易于控制,反应后阳性克隆只通过 PCR 扩增后琼脂糖凝胶电泳即可检测,从而为植物基因功能研究提供了强有力的支持。而笔者采用的方法是在传统的基础上略加进步的载体构建方式,即利用最新的入门克隆载体,该载体上已经连入 attL 序列,这样就跳过了 BP 反应,直接将纯化回收后的 PCR 产物通过

TOPO 克隆反应连入入门克隆载体就可以进行 LR 反应了,与传统 BP 加 LR 反应相比更加方便快捷。在选择入门克隆的时候要注意入门克隆载体与表达载体的抗性,二者的抗性要求是不同的,这样也方便后续筛选阳性克隆,本试验构建 RNAi 载体的入门克隆在片段连入时对连入的方向也进行了选择,所以在设计引物时在前引物的 5' 端增加了 CACC 4 个碱基。本试验应用的 Gateway 技术构建载体操作简单,省去

H10_111170113_T attB2c.txt 551bp.txt Consensus	TTTGGGTCTAGAAACATTAAATTATAATAAAATGTCATT ..... .....ATTATAAATATAAAATGTCATT .....	40 0 22 Consensus	H10_111170113_T attB2c.txt 551bp.txt Consensus	TCAAAGTTCACAGATATTTCTCCATTGTTTCTCCTCAAA ..... .....TCAAAGTTCACAGATATTTCTCCATTGTTTCTCCTCAAA .....	360 0 342 Consensus
H10_111170113_T attB2c.txt 551bp.txt Consensus	CGATATGACTTTTCTTCTTCACCTTCCTCAGAACGCGTT ..... .....CGATATGACTTTTCTTCTTCACCTTCCTCAGAACGCGTT .....	80 0 62 Consensus	H10_111170113_T attB2c.txt 551bp.txt Consensus	TTGAACCTAAAATCCCTTCGATTTCGCCACACAGAGAAAAAG ..... .....TTGAACCTAAAATCCCTTCGATTTCGCCACACAGAGAAAAAG .....	400 0 382 Consensus
H10_111170113_T attB2c.txt 551bp.txt Consensus	TGTTACTTGCAATGTAATTTTTCACACCACTTCCTGCGG ..... .....TGTTACTTGCAATGTAATTTTTCACACCACTTCCTGCGG .....	120 0 102 Consensus	H10_111170113_T attB2c.txt 551bp.txt Consensus	ACAACGCTGTTCCTTCTGCGTACACCGGATTCATCAAGGAA ..... .....ACAACGCTGTTCCTTCTGCGTACACCGGATTCATCAAGGAA .....	440 0 422 Consensus
H10_111170113_T attB2c.txt 551bp.txt Consensus	TTAGTGTTCATGCAGCAACATGTTAACCTTAGTGACAGT ..... .....TTAGTGTTCATGCAGCAACATGTTAACCTTAGTGACAGT .....	160 0 142 Consensus	H10_111170113_T attB2c.txt 551bp.txt Consensus	GAGATTCAAAGGATCAAGGCCAGTAATCTGATATTAGCC ..... .....GAGATTCAAAGGATCAAGGCCAGTAATCTGATATTAGCC .....	480 0 462 Consensus
H10_111170113_T attB2c.txt 551bp.txt Consensus	AAGATGTGGGCATTGTGCAAAATATGCTTTCTGTTAATATT ..... .....AAGATGTGGGCATTGTGCAAAATATGCTTTCTGTTAATATT .....	200 0 182 Consensus	H10_111170113_T attB2c.txt 551bp.txt Consensus	ATCGTGAAGCTTTTAGCACTGCTGCCAAAAATTTGGGCACA ..... .....ATCGTGAAGCTTTTAGCACTGCTGCCAAAAATTTGGGCACA .....	520 0 502 Consensus
H10_111170113_T attB2c.txt 551bp.txt Consensus	GGATCTTTAATTCAAGCTCTACCCCTTCAAGATGTTCAAA ..... .....GGATCTTTAATTCAAGCTCTACCCCTTCAAGATGTTCAAA .....	240 0 222 Consensus	H10_111170113_T attB2c.txt 551bp.txt Consensus	TTTTCCACATATTCACCTTTGGACTCAAGCTGGAGGGCAAC ..... .....TTTTCCACATATTCACCTTTGGACTCAAGCTGGAGGGCAAC .....	560 0 542 Consensus
H10_111170113_T attB2c.txt 551bp.txt Consensus	AGCTGCAAAAGGCAACAGTACACAAATGTTGAAAAATAATTC ..... .....AGCTGCAAAAGGCAACAGTACACAAATGTTGAAAAATAATTC .....	280 0 262 Consensus	H10_111170113_T attB2c.txt 551bp.txt Consensus	AAATAGCGAAGGGTGGGCGCGCGACCCAGCTTTCTTGTA ..... .....AAATAGCGAAGGGTGGGCGCGCGACCCAGCTTTCTTGTA .....	600 16 551 Consensus
H10_111170113_T attB2c.txt 551bp.txt Consensus	TAGTAATTATAAAGCTTATGGTTTCATCATCATCATCCTCT ..... .....TAGTAATTATAAAGCTTATGGTTTCATCATCATCATCCTCT .....	320 0 302 Consensus	H10_111170113_T attB2c.txt 551bp.txt Consensus	CAAAGTGGTGAATATCAGTGTTCAGAACACCTCATGG ..... .....CAAAGTGGTGAATATCAGTGTTCAGAACACCTCATGG .....	640 25 551 Consensus

图4 超表达载体的序列比对

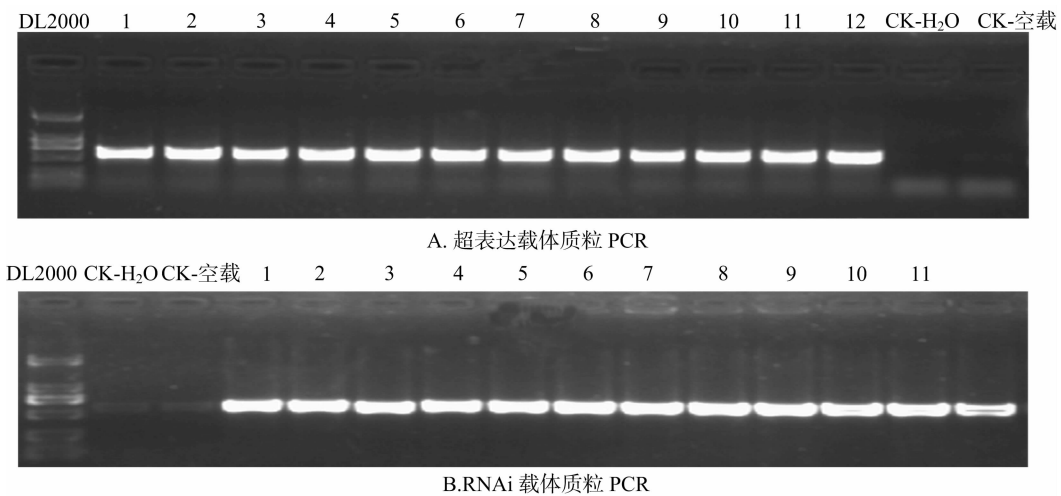


图5 LR 反应后载体克隆 PCR 检测

了大量的酶切、测序等验证步骤,是一种简便、高效植物表达载体构建技术。

3.2 结论

本试验对供试的 2 个番茄品系的 *fasciated* 基因部分序列 (551 bp,包括完整的编码序列)进行了比对,发现 2 个供试番茄材料中该基因序列完全一致。

同时利用 Gateway 技术构建了 *fasciated* 基因的 RNAi 及超表达载体,准备将其分别转录到少心室番茄 FL1 和 MLK1 中去,为进一步研究该基因与心室之间的关系做准备。

参考文献:

[1] 杨晖,蒋新龙,陈先知. 影响番茄花芽分化的因素及与畸形果发生的关系[J]. 长江蔬菜,2005(2):35-37  
[2] 姚建明,马忠翼. 番茄畸形果与品种性状的相关及其遗传表现

[J]. 浙江农业学报,1995,7(3):222-225  
[3] 李悦,李天来,王丹. 番茄子房心室形成与花芽分化期幼苗茎尖相关代谢物质含量的关系[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版),2008,34(3):273-280.  
[4] Lippman Z, Tanksley S D. Dissecting the genetic pathway to extreme fruit size in tomato using a cross between the smallfruited wild species *Lycopersicon pimpinellifolium* and *L. esculentum* var. *giant heirloom* [J]. Genetics,2001,158(1):413-422.  
[5] Liu S, Li T L. Regulation effects of exogenous gibberellin acid (GA<sub>3</sub>) on the formation of tomato (*Solanum lycopersicum*) ovary locule and fasciated transcription[J]. African Journal of Biotechnology,2012,11(72):13732-13738.  
[6] Cong B, Barrero L S, Tanksley S D. Regulatory change in YABBY-like transcription factor led to evolution of extreme fruit size during tomato domestication[J]. Nature genetics,2008,40(6):800-804.