

## 大豆耐盐基因 *GmHAL3a* 的克隆及 RNAi 载体的构建

王明霞, 崔晓霞, 薛晨晨, 徐筋燕, 薛冬, 郭娜, 邢邯

(南京农业大学 国家大豆改良中心, 江苏 南京 210095)

**摘要:** 利用同源克隆方法从大豆中克隆到一个耐盐基因 *HAL3*, 命名为 *GmHAL3a*, 组织表达分析发现 *GmHAL3a* 基因在大豆根中表达量最高, 荚中次之, 叶中表达量最低; 非生物胁迫实验表明该基因受 NaCl、LiCl 和山梨醇诱导表达; 通过生物信息学的方法分析发现该基因具有 2 个跨膜螺旋区域, 可能定位于叶绿体中; 同源序列比对证实该基因氨基酸序列具有与其他物种相似的保守位点: 黄素单核苷酸 (FMN) 结合位点和磷酸泛酰半胱氨酸 (PPC) 脱羧酶活性位点。同时扩增了这个基因的 2 个干扰片段, 用 Gateway 技术将扩增的片段通过 BP 反应连接到入门载体 pDONR221, 测序后又通过 LR 反应分别将目的片段插入到 RNAi 载体 pB7GWIWG2(II), 再转入根癌农杆菌 EHA105 中。这 2 个载体的构建对于进一步研究大豆中 *GmHAL3a* 基因的功能具有重要意义。

**关键词:** Gateway 技术; 大豆; RNA 干扰; *GmHAL3a* 基因

**中图分类号:** S565.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9841(2013)01-0012-07

## Cloning of Halotolerance 3 Gene and Construction of Its RNAi Vector in Soybean (*Glycine max*)

WANG Ming-xia, CUI Xiao-xia, XUE Chen-chen, XU Jin-yan, XUE Dong, GUO Na, XING Han

(National Center for Soybean Improvement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China)

**Abstract:** Halotolerance 3 gene was isolated from soybean (*Glycine max*) by homology cloning, designed as *GmHAL3a*. Tissue specific analysis found that *GmHAL3a* expressed mainly in root, relatively lower in pod and lowest in leaf. RT-PCR revealed that the expression of *GmHAL3a* was induced by salt, LiCl and sorbitol. Bioinformatics analysis indicated that *GmHAL3a* had two transmembrane helices regions and two conserved domains, flavin mononucleotide (FMN) binding sites and 4'-phosphopantothienoylcysteine (PPC) decarboxylase activity sites, and was possibly localized in chloroplast. We cloned two segments of *GmHAL3a*, ligated into entry clone vector (pDONR221) by BP reaction, and then ligated into RNAi transformation vector pB7GWIWG2(II) by LR reaction. Finally we transformed the two vectors into *Agrobacterium tumefaciens* EHA105. The results provide foundation for further research the function of *GmHAL3a* gene in soybean.

**Key words:** Gateway technology; Soybean; RNA interference; *GmHAL3a* gene

*HAL3* (Halotolerance 3) 基因广泛存在于动物、植物和真菌中, 是前人在筛选酵母耐盐基因过程中分离克隆的耐逆相关基因, 而且是一种参与细胞分裂的黄素单核苷酸 (FMN) 结合蛋白<sup>[1-2]</sup>。过表达该基因不仅能够通过增强  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  动态平衡来提高植物的耐盐性, 还能促进细胞分裂, 加速植株生长<sup>[3-4]</sup>。研究发现, *HAL3* 具有磷酸泛酰半胱氨酸 (PPC) 脱羧酶<sup>[5-9]</sup> 或者 PPC 脱羧酶亚基的功能<sup>[10]</sup>。近期研究表明, 蓝光和红光会抑制 *HAL3* 表达, 明显降低其蛋白积累<sup>[11-12]</sup>。同时蛋白互作实验发现, *HAL3* 作用在 *Ppz1* 的上游, 并通过抑制 *Ppz1* 的磷酸酶活性进而对下游的蛋白进行调节<sup>[13-14]</sup>。*HAL3/Ppz1* 能够调控 *Trk1* 的表达<sup>[15]</sup>, 而 *HAL3/Ppz1* 又受 PP2C 类丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶 (Ptc1) 的调控<sup>[16]</sup>。

目前 *HAL3* 基因在大豆中的研究尚未见报道, 而

且前人在对 *HAL3* 基因进行功能分析中, 也很少用到 RNA 干扰 (RNAi) 方法。RNAi 是指一些小双链 RNA 高效、特异地阻断体内特定基因的表达, 促使 mRNA 降解, 从而使细胞表现出特定基因缺陷表型的过程<sup>[17]</sup>。

本研究从大豆中克隆 *GmHAL3a* 基因, 并用 Gateway 技术构建其 RNAi 载体, 对 *HAL3* 基因在植物中, 特别是双子叶植物中的功能研究是一个新的突破, 具有重要的理论和实践意义。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料和试剂

1.1.1 植物材料 大豆品种苏协 1 号由南京农业大学种质资源库保存。大豆种子种植于装有营养土和蛭石 (比例为 1:2) 的花盆中, 在人工气候箱培养, 10 d 后取其叶片, 放于  $-80^\circ\text{C}$  冰箱中保存。

收稿日期: 2012-09-26

基金项目: 国家转基因专项 (2011ZX08004-002-001); 公益性行业 (农业) 科研专项 (CARS-004-PS10); 国家重点基础研究发展计划“973 计划”项目课题 (2009CB118400); 江苏省科学技术厅项目 (BE2011305)。

第一作者简介: 王明霞 (1986-), 女, 在读硕士, 研究方向为大豆的分子生物学。E-mail: yuewang0122@126.com。

通讯作者: 邢邯 (1963-), 男, 教授, 博士生导师, 从事大豆遗传育种研究。E-mail: hanx@njau.edu.cn。

1.1.2 菌株、载体及试剂 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  菌株购自天根生化科技(北京)有限公司;根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 EHA105 由本实验室保存;入门载体 pDONR221 购于 Invitrogen 公司;表达载体 pB7GWIWG2 (II) 由中国农业科学院作物研究所傅彬英教授惠赠。RNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;ExTaq DNA 聚合酶、M-MLV 反转录酶、pMD18-T Vector 购自 TaKaRa 公司;琼脂糖 DNA 回收试剂盒购自上海赛百盛公司;Gateway BP reaction 试剂盒、LR reaction 试剂盒购自 Invitrogen 公司,引物合成委托 Invitrogen 公司完成。

## 1.2 目的基因 *GmHAL3a* 的克隆

采用 Invitrogen 公司总 RNA 提取试剂盒提取于  $-80^{\circ}\text{C}$  保存的大豆叶片总 RNA,利用 RT-PCR 方法合成 cDNA。根据拟南芥 *AtHAL3* 基因的序列在 Phytozome (<http://www.phytozome.net/search.php>) 上对大豆基因组进行 BLAST,得到与拟南芥 *AtHAL3* 同源序列较多的一个基因,命名为 *GmHAL3a*。利用 primer 5.0 对该基因设计特异性引物 *GmHAL3a*-f 和 *GmHAL3a*-r(表 1)。

以大豆叶片的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,20  $\mu\text{L}$  的反应体系,PCR 扩增程序为:95 $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,56 $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min,共 33 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min;4 $^{\circ}\text{C}$  保存。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后用试剂盒回收目标条带,并连接到 pMD19-T vector,再将克隆片段送往 Invitrogen 公司进行测序。测序结果分析发现所克

隆的基因和网上大豆基因组数据库中该基因的序列有 99% 的相似性,氨基酸序列完全一样,证实为同一个基因。

## 1.3 *GmHAL3a* 基因的生物学分析与表达分析

对 *GmHAL3a* 基因编码的氨基酸序列的理化性质进行分析,用 SoftBerry 的亚细胞定位软件 ProtComp9.0 在线分析 *GmHAL3a* 基因氨基酸序列,利用 TMpred 在线软件预测该基因的跨膜螺旋区域,在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上搜索其他已报道物种 *HAL3* 基因的氨基酸序列,用 DNAMAN 软件分析大豆中 *HAL3* 基因的序列结构。

分别取大豆开花后 20 d 的根、茎、叶、花、荚和籽粒,提取总 RNA,qRT-PCR 分析 *GmHAL3a* 基因在各个组织中的表达情况。

将培养 10 d 的植株水培 2 d 后分别用 100  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl、50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  LiCl 和 200  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  山梨醇进行胁迫处理,分别在处理 0、1、3、6、12、24 h 时取叶片,提取总 RNA,qRT-PCR 分析 *GmHAL3a* 基因的诱导表达情况。

## 1.4 目标区段的选择、引物设计及 RNAi 片段的获得

分别以 *GmHAL3a* mRNA 序列在 NCBI 网站上作 BLAST 分析,比较与大豆中其他基因的同源性,最后选择特异性较高的区域作为 RNA 干扰区段,用 Primer Premier 5.0 软件设计 2 对引物用来克隆,并在正向引物和反向引物两端分别加上 attB1 和 attB2 位点序列。同时设计 35s CaMV 启动子和终止子引物,即 CaMV35s 和 CaMV35s-Terminate(表 1)。

表 1 引物序列

Table 1 Primers used in study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence(5'→3')
<i>GmHAL3a</i> -f	TATTAGGCAGCCGAACC
<i>GmHAL3a</i> -r	GCTACGAGGCATAAAGGAGT
<i>GmHAL3a</i> (1)-f'	ATGGCCGGTTCAGAACCT
<i>GmHAL3a</i> (1)-r'	GACCATTTCATTGTCATCCGTG
<i>GmHAL3a</i> (2)-f'	ATGGCCGGTTCAGAACCT
<i>GmHAL3a</i> (2)-r'	GGGCATTGCTGCTCTATCA
<i>GmHAL3a</i> (1)-f	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCCGGTTCAGAACCT
<i>GmHAL3a</i> (1)-r	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCGACCATTCATTGTCATCCGTG
<i>GmHAL3a</i> (2)-f	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCCGGTTCAGAACCT
<i>GmHAL3a</i> (2)-r	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCGGGCATTGCTGCTCTATCA
AttB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC
AttB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC
CaMV35s	GACGCACAATCCCACTATCC
CaMV35s-Terminate	GCTCAACACATGAGCGAAAC

以大豆叶片的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,并连接到 pMD19-T vector,阳性克隆送往 Invitrogen 公司测序,对测序结果正确的菌液提取质粒,用设计的接头引物进行 PCR 扩增,纯化得到目的基因片段,紫外分光光度计检测产物浓度。

### 1.5 Gateway 技术构建 RNAi 载体

**1.5.1 BP 反应** BP 反应体系 (10  $\mu\text{L}$ ): pDON-ER221 0.5  $\mu\text{L}$ , attB-PCR 2  $\mu\text{L}$ , BP Clone<sup>TM</sup> 酶 1  $\mu\text{L}$ , TE-Buffer 6.5  $\mu\text{L}$ 。短暂离心后 25 $^{\circ}\text{C}$  水浴 13 ~ 15 h, 加入 1  $\mu\text{L}$  Proteinase K solution, 37 $^{\circ}\text{C}$  温育 10 min, 终止 BP 反应。

取 2  $\mu\text{L}$  BP 反应液用热激法转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞,将转化的细胞均匀涂在 LB 固体培养基上(加 50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  卡那霉素), 37 $^{\circ}\text{C}$  摇床培养 8 ~ 12 h。挑取单克隆,用接头引物 PCR 检测,阳性克隆送往 Invitrogen 公司测序。测序结果正确的克隆提取质粒作为入门载体进行下一步实验。

**1.5.2 LR 反应** LR 反应体系 (10  $\mu\text{L}$ ): Entry clone 4  $\mu\text{L}$ , pB7GWIWG2 (II) 1  $\mu\text{L}$ , TE-Buffer 3  $\mu\text{L}$ , LR Clone<sup>TM</sup> 酶 2  $\mu\text{L}$ 。短暂离心后 25 $^{\circ}\text{C}$  水浴 13 ~ 15 h, 加入 1  $\mu\text{L}$  Proteinase K solution, 37 $^{\circ}\text{C}$  温育 10 min, 终止 LR 反应。

取 2  $\mu\text{L}$  LR 反应液热激法转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞,将转化的细胞均匀涂在 LB 固体培养基上(加 50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  壮观霉素), 37 $^{\circ}\text{C}$  摇床上培养 8 ~ 12 h。挑取单克隆,分别用 CaMV35s、GmHAL3a (1)-r、CaMV35s-Terminate 和 GmHAL3a (1)-r、GmHAL3a (1)-f、GmHAL3a (1)-r 等 3 对引物进行 PCR 扩增,另一干扰载体用同样的方法扩增检测,阳性克隆送往 Invitrogen 公司测序。测序正确的菌液提取质粒作为表达载体。

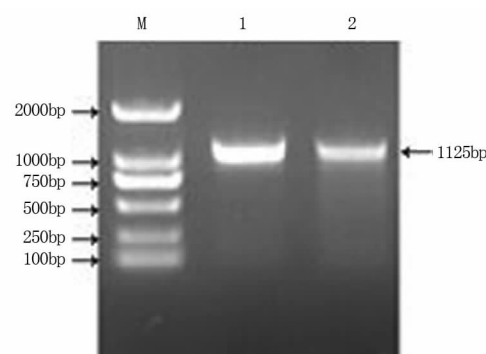
### 1.6 农杆菌的转化

将构建好的 RNAi 载体用冻融法转化根癌农杆菌 EHA105,转化的细胞均匀涂在 YEB 固体培养基上(含 50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  壮观霉素和 50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的利福平), 28 $^{\circ}\text{C}$  摇床上培养 24 ~ 36 h。阳性克隆扩大培养后部分保存在 -80 $^{\circ}\text{C}$  冰箱备用。

## 2 结果与分析

### 2.1 GmHAL3a 基因的克隆

提取大豆叶片的总 RNA,反转为 cDNA,以 cDNA 为模板,用 GmHAL3a-f 和 GmHAL3a-r 克隆出大豆耐盐基因 GmHAL3a (图 1),并连接到 pMD19-T vector 上,测序结果表明所克隆的基因序列是正确的。



M: DL 2 000 Marker; 1, 2: GmHAL3a 的 PCR 产物

M: DL 2 000 Marker; 1, 2: The PCR products of GmHAL3a

图 1 GmHAL3a 基因 PCR 扩增产物

Fig. 1 The PCR products of GmHAL3a

### 2.2 GmHAL3a 基因的生物学分析与组织表达分析

对 GmHAL3a 基因编码的氨基酸序列的理化性质进行分析,发现该基因编码蛋白的分子量为 2.31 KD, 等电点 PI 为 5.80, 蛋白呈酸性。利用 TMpred 在线软件分析该基因的跨膜螺旋区域,预测得分超过 500 的区域为可能的跨膜螺旋区域,符合条件的有 2 个区域: 27 ~ 46 氨基酸处膜外向膜内的跨膜螺旋和 99 ~ 117 氨基酸处膜内向膜外的跨膜螺旋,得分分别为 790 和 753 (图 2)。用 SoftBerry 的亚细胞定位软件 ProtComp9.0 在线分析 GmHAL3a 基因氨基酸序列,结果表明此基因可能定位于叶绿体中。

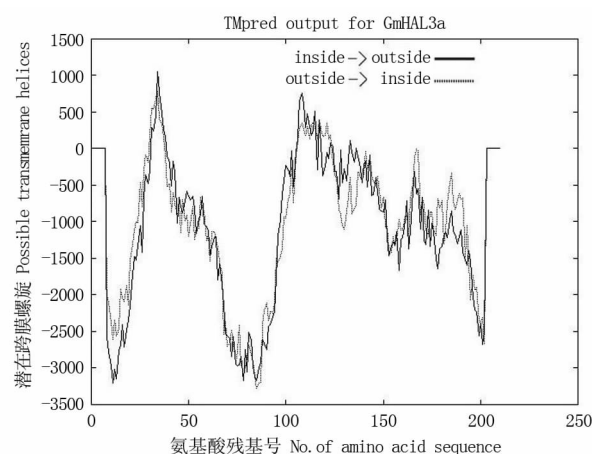
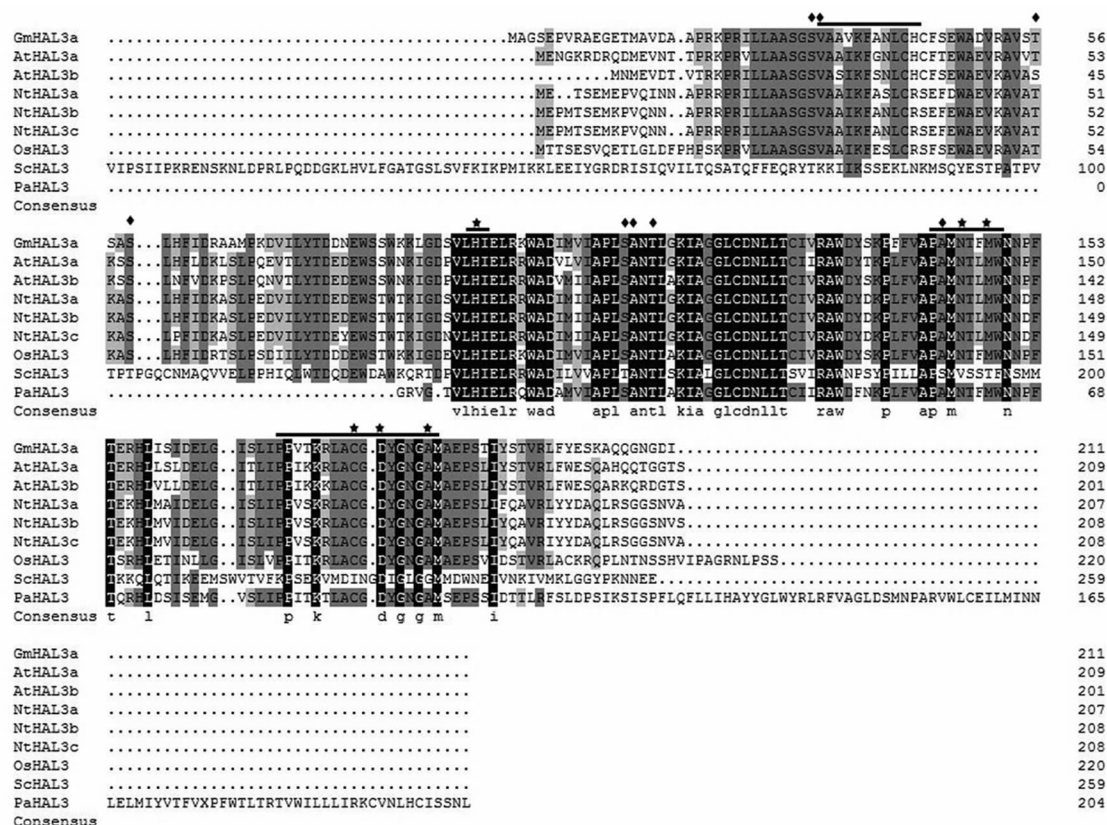


图 2 GmHAL3a 的跨膜结构分析

Fig. 2 Analysis of on line transmembrane domain of GmHAL3a

在 NCBI 网站上下下载已经报道的物种中 HAL3 基因的氨基酸序列,其中包括:酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*),拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*),烟草 (*Nicotiana tabacum*),水稻 (*Oryza sativa*),欧洲云杉 (*Picea abies*)。用 DNAMAN 软件进行比对,发现大豆 GmHAL3a 氨基酸序列和其他物种具有相似的功能保守区域,既能够与黄素单核苷酸 (FMN) 结合,还具有磷酸泛酰半胱氨酸 (PPC) 脱羧酶的功能 (图 3)。

图3 大豆与其他物种 *HAL3* 基因氨基酸序列比对Fig.3 Sequence multialignment of the *GmHAL3a* with various *HAL3* proteins from other species

*GmHAL3a* 基因在大豆的各个组织中均有表达,但表达水平有所不同,在根中相对表达水平最高,莢中次之,叶中相对表达量最低(图4A)。分别用  $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl、 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  LiCl 和  $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  山梨醇胁迫处理并进行 qRT-PCR 分析,发现该基因受 NaCl、LiCl 和山梨醇的诱导表达,在用  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  LiCl 处理 6 h 时对其诱导表达最强烈,用  $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 和  $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  山梨醇处理 1 h 时该基因就得到了强烈的诱导表达(图4B、C、D)。

### 2.3 *GmHAL3a* 基因 RNAi 区段的克隆

以大豆叶片 cDNA 为模板,分别用 *GmHAL3a* (1)-f', *GmHAL3a* (1)-r' 和 *GmHAL3a* (2)-f', *GmHAL3a* (2)-r' 2 对引物扩增,得到 2 个 RNAi 区段(图5),并将其连接到 pMD19-T vector 上,测序结果和目标序列完全相同。

### 2.4 RNAi 载体的构建

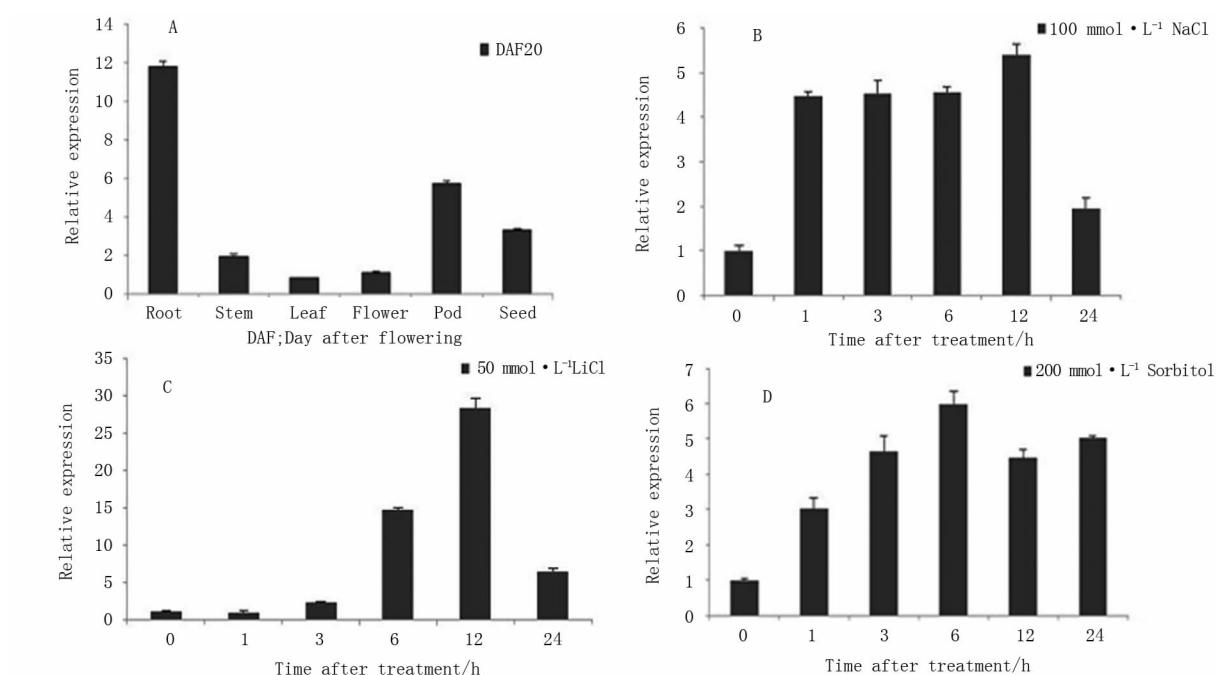
2.4.1 入门载体的获得 将 attB-PCR 产物连接到入门载体 pDONR221 上,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态,用接头引物 PCR 检测,并把阳性克隆测序,测序结果与目的片段序列完全一致,说明 RNAi 片段正确插入

到入门载体中。对测序正确的提取质粒(图6)。

2.4.2 表达载体的构建 利用入门载体把目的片段连接到表达载体 pB7GWIWG2 (II) 中(图7),将 RNAi 目标片段按正、反两个方向插入到载体的内含子两侧。转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态,用 CaMV35s、*GmHAL3a* (1)-r、CaMV35s-Terminate 分别和 *GmHAL3a* (1)-r、*GmHAL3a* (1)-f、*GmHAL3a* (1)-r 等 3 对引物进行 PCR 扩增,另一干扰载体用同样的方法扩增检测,都能得到 PCR 产物,表明所得到的克隆均为阳性克隆, RNAi 载体构建成功(图7)。每个 RNAi 区段选择一个阳性克隆提取质粒(图8)。

### 2.5 RNAi 表达载体转化农杆菌

构建好的 RNAi 表达载体用冻融法转化根癌农杆菌 EHA105,挑取单克隆进行 PCR 检测(图9),其中 1、2、3 是用 *GmHAL3a* (1)-r 和 *GmHAL3a* (1)-f 检测的结果,4、5、6 为 CaMV35s 和 *GmHAL3a* (1)-r 检测的结果,7、8、9 为 CaMV35s-Terminate 和 *GmHAL3a* (1)-r 检测的结果,1、4、7 为一个单克隆,以此类推。证明所构建的 RNAi 载体都正确转入到根癌农杆菌 EHA105 中。

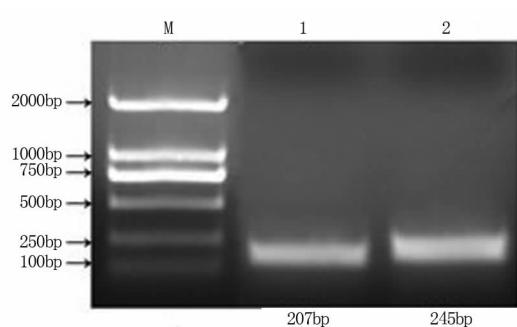


(A)大豆 *GmHAL3a* 基因在花后 20 天的大豆不同组织中的表达;(B. C. D) *GmHAL3a* 基因在 100 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl、50 mmol·L<sup>-1</sup> LiCl 和 200 mmol·L<sup>-1</sup> 山梨醇胁迫处理后的表达。

(A) *GmHAL3a* expression in various organs of soybean plants; (B. C. D) Real-time RT-PCR analysis of *GmHAL3a* gene expression under 100 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, 50 mmol·L<sup>-1</sup> LiCl and 200 mmol·L<sup>-1</sup> sorbitol treatment.

图 4 *GmHAL3a* 基因在大豆中的组织表达分析和非生物胁迫分析

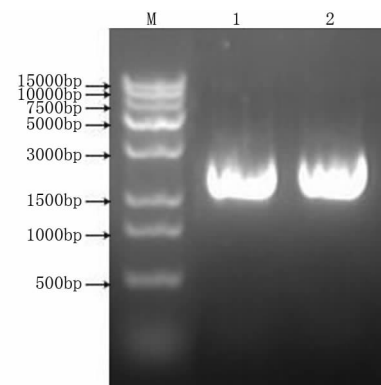
Fig. 4 Tissue expression and abiotic stress analysis of *GmHAL3a* in soybean



M; DL 2,000 Marker; 1; *GmHAL3a*-2; 2; *GmHAL3a*-1

图 5 *GmHAL3a* 基因 RNAi 区段的 PCR 产物

Fig. 5 The RNAi segments of *GmHAL3a* gene's PCR products



M; DL 2,000 Marker; 1, 2; *GmHAL3a* 入门载体 PCR 产物

M; DL 2,000 Marker; 1, 2; PCR products of *GmHAL3a* entry vector

图 6 BP 反应质粒的鉴定

Fig. 6 Identification of BP reaction plasmid

隆,不需要再进行测序。

植物的耐逆性一直以来都受到植物学家及广大学者的关注,本文所研究的耐盐基因 *HAL3* 在拟南芥、烟草、水稻等植物中都有研究,这些研究表明该基因在叶中表达量相对其它器官较低,且受盐、锂和渗透胁迫诱导<sup>[3,4,12]</sup>,在水稻中,*HAL3* 基因还被发现介导了一个与普通光受体模式不同的光控发育机制,该基因编码的蛋白以三聚体的形式行使功能,而光照,特别是蓝光可以促使三聚体解体,从而导致该蛋白功能失活;同时,光线还能抑制该基因的表达<sup>[12]</sup>。本研究首次从大豆中克隆了一个 *HAL3* 基

### 3 讨论

构建 RNAi 载体有多种方法,包括传统的以酶切-连接为基础和以重组 PCR 为基础结合酶切-连接的方式,还有以同源重组为基础的方式。本文以同源重组的进化方式即 Gateway 技术构建了 RNAi 植物表达载体,这种方法相对酶切-连接构建表达载体来说,只需通过简单、高效的 BP 和 LR 反应就可实现把 PCR 产物定向转入表达载体,适合大批量、高通量的研究工作<sup>[18]</sup>。为有效的将目的片段转入入门载体,BP 反应时 attB-PCR 产物的用量要高于载体的量。表达载体构建后通过 3 对引物检测阳性克

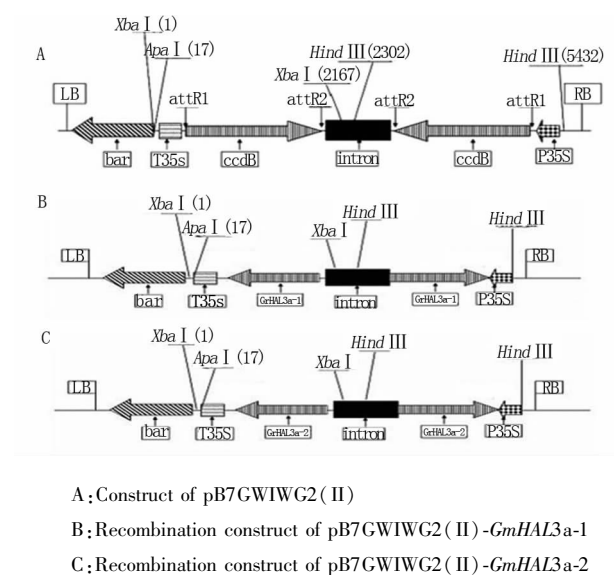


图7 表达载体结构图

Fig. 7 Construct of the expression vector

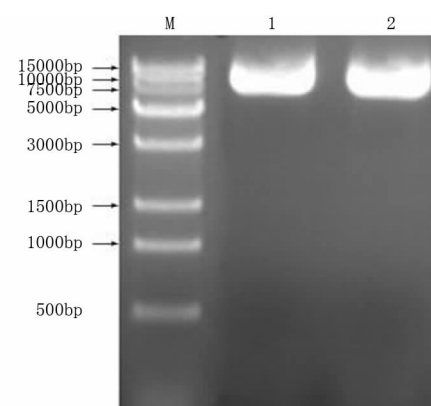


图8 LR反应质粒的鉴定

Fig. 8 Identification of LR reaction plasmid

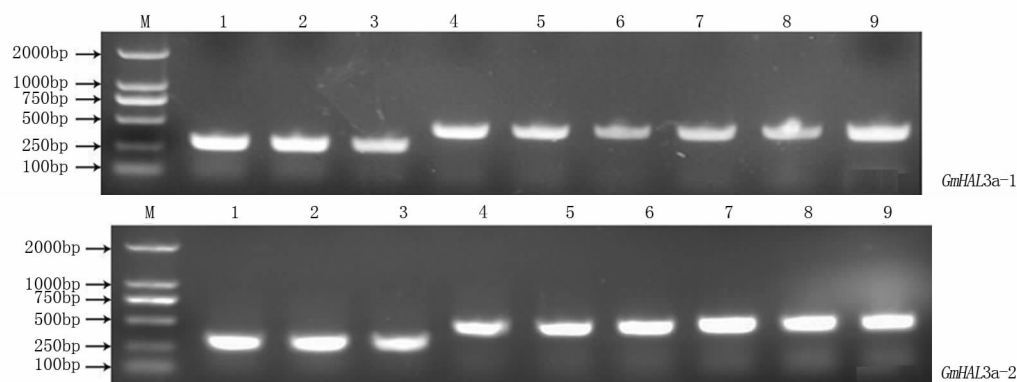


图9 农杆菌转化阳性克隆 PCR 检测

Fig. 9 The PCR products of positive clones for *Agrobacterium* mediated transformation

因,组织表达分析发现其在根中表达量最高、叶中表达量最低,这个结果和其他植物上的研究类似,这可能是由于叶片直接受光照射,*GmHAL3a* 基因的三聚体解体导致该基因表达量降低,而根不直接受光照射。非生物胁迫分析的结果表明大豆中 *GmHAL3a* 基因是受 NaCl、LiCl 和山梨醇诱导表达的,NaCl 和山梨醇处理 1 h 后其表达量达到了处理前的 3~4.5 倍,而 LiCl 虽然对其诱导表达时间较晚,但也最强烈,处理 6 h 后诱导表达量就为处理前的 14 倍。

生物信息学分析发现 *GmHAL3a* 基因编码蛋白分子量为 2.31 KD,等电点 PI 为 5.80,具有 2 个跨膜螺旋区域,与拟南芥、烟草、水稻等中的 *HAL3* 基因的氨基酸序列有相似的保守位点,即具有能够与黄素单核苷酸(FMN)结合的氨基酸残基位点和磷酸泛酰半胱氨酸(PPC)脱羧酶活性位点,预测大豆中的 *GmHAL3a* 基因可能是 FMN 结合蛋白,并且具有 PPC 脱羧酶或者 PPC 脱羧酶亚基功能。

该研究构建了 *GmHAL3a* 基因的 2 个干扰载体,

所用的载体不含抗生素基因,为成功获得安全、高效的转基因大豆新品种做好了物质储备,同时为 *HAL3* 基因在大豆中的功能研究奠定了基础。

## 参考文献

- [1] Ferrando A, Kron S J, Rios G, et al. Regulation of cation transport in *Saccharomyces cerevisiae* by the salt tolerance gene *HAL3* [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1995, 15(10): 5470-5481.
- [2] Di-Como C J, Bose R, Arndt K T. Overexpression of *SIS2*, which contains an extremely acidic region, increases the expression of *SWI4*, *CLN1* and *CLN2* in *sit4* mutants [J]. *Genetics*, 1995, 139(1): 95-107.
- [3] Espinosa-Ruiz A, Bellés J M, Serrano R, et al. *Arabidopsis thaliana* *AtHAL3*: a flavoprotein related to salt and osmotic tolerance and plant growth [J]. *The Plant Journal*, 1999, 20(5): 529-539.
- [4] Yonamine I, Yoshida K, Kido K, et al. Overexpression of *NtHAL3* genes confers increased levels of proline biosynthesis and the enhancement of salt tolerance in cultured tobacco cells [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55(396): 387-395.
- [5] Hernández-Acosta P, Schmid D G, Jung G, et al. Molecular characterization of the *Arabidopsis thaliana* flavoprotein *AtHAL3a* reveals

- the general reaction mechanism of 4'-phosphopantothienylcysteine decarboxylases [J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277 (23):20490-20498.
- [6] Steinbacher S, Hernández-Acosta P, Bieseler B, et al. Crystal structure of the plant PPC decarboxylase AtHAL3a complexed with an ene-thiol reaction intermediate [J]. Journal of Molecular Biology, 2003, 327(1):193-202.
- [7] Kupke T, Hernández-Acosta P, Steinbacher S, et al. *Arabidopsis thaliana* flavoprotein AtHAL3a catalyzes the decarboxylation of 4'-phosphopantothienylcysteine to 4'-phosphopantetheine, a key step in coenzyme A biosynthesis [J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(22):19190-19196.
- [8] Rubio S, Larson T R, Gonzalez-Guzman M, et al. An *Arabidopsis* mutant impaired in coenzyme A biosynthesis is sugar dependent for seedling establishment [J]. Plant Physiology, 2006, 140 (3): 830-843.
- [9] Zhang N, Wang X, Chen J. Role of OsHAL3 protein, a putative 4' phosphopantothienylcysteine decarboxylase in rice [J]. Biochemistry, 2009, 74(1):78-85.
- [10] Ruiz A, González A, Muñoz I, et al. Moonlighting proteins HAL3 and Vhs3 form a heteromeric PPCDC with Ykl088w in yeast CoA biosynthesis [J]. Nature Chemical Biology, 2009, 5(12):920-928.
- [11] Baerenfaller K, Grossmann J, Grobe M A, et al. Genome-scale proteomics reveals *Arabidopsis thaliana* gene models and proteome dynamics [J]. Science, 2008, 320(5878):938-941.
- [12] Sun S Y, Chao D Y, Li X M, et al. OsHAL3 mediates a new pathway in the light-regulated growth of rice [J]. Nature Cell Biology [J], 2009, 11(7):845-851.
- [13] De Nadal E, Clotet J, Posas F, et al. The yeast halotolerance determinant HAL3p is an inhibitory subunit of the Ppz1p Ser/Thr protein phosphatase [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998, 95(13):7357-7362.
- [14] Clotet J, Gari E, Aldea M, et al. The yeast Ser/Thr phosphatases Sit4 and Ppz1 play opposite roles in regulation of the cell cycle [J]. Molecular and Cellular Biology, 1999, 19(3):2408-2415.
- [15] Yenush L, Mulet M, Ariño J, et al. The Ppz protein phosphatases are key regulators of K<sup>+</sup> and pH homeostasis; implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression [J]. The EMBO Journal, 2002, 21(5):920-929.
- [16] Ruiz A, González A, García-Salcedo R, et al. Role of protein phosphatases 2C on tolerance to lithium toxicity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Molecular Microbiology, 2006, 62(1):263-277.
- [17] Fire A, Xu S Q, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. Nature, 1998, 391(6669):806-811.
- [18] 马建, 魏益凡, 厉志, 等. 植物 RNA 干扰表达载体构建方法的研究 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(18):8364-8366. (Ma J, Wei Y F, Li Z, et al. Study on the construction method of plant RNAi expression vector [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences [J]. 2009, 37(18):8364-8366.)

## 中黄 30“落户”陇原乡村

甘肃省武威市农业局 韦 瑛

中黄 30 是中国农业科学院作物科学研究所选育并通过国家审定的大豆新品种。近年来,该所与国家大豆产业技术体系镇原综合试验站、甘肃省农业技术推广总站及各市县相关科研、推广部门合作,开展中黄 30 适宜种植区域和配套栽培技术的研究,发现该品种特别适合与其它作物间套作。2012 年,该品种在甘肃省种植面积已达到 60 多万亩。在沿黄灌区和河西走廊,中黄 30 主要与马铃薯、小麦、玉米、西瓜、食葵、孜然、大蒜、甜叶菊、胡麻及幼龄果树等作物套种栽培;在陇东黄土高原旱作农业区、陇南山区半干旱半湿润区,中黄 30 主要在油菜或冬小麦收获后夏播复种,或在幼龄果园内春播套种。结合其它农业推广项目,甘肃省科技人员将全膜双垄沟播技术、一膜两年用技术、全膜覆土穴播技术、适期精量播种技术、科学施肥及病虫害防治等综合栽培技术在中黄 30 生产中推广应用,涌现出了不少高产典型。如武威市民勤县双茨科乡三杰西村四组农户曾令朋,2008 年单种 1.5 亩,平均亩产达到 271 公斤;武威市凉州区下双乡河水村一组农户胡德福,2009 年在 1.7 亩地膜玉米茬上免耕直播,亩产达到 276.8 公斤;2012 年 10 月 7 日,以南京农业大学国家大豆改良中心邱家驹教授任组长的专家组,对酒泉市肃州区铎尖乡集泉村 1 组孜然套种中黄 30 高产示范田进行了现场测产验收,实收 1.07 亩,现场打碾称重计产,折合亩产 289.8 公斤,创造了全国间套种大豆的高产纪录。

近几年来,甘肃省大豆种植面积和单产呈现稳中有升的发展趋势,种植面积由 2005 年的 180 万亩,发展到 2012 年的 230 万亩,单产水平提高 20% 以上。对此,镇原综合试验站站长张国宏研究员深有感触地说:“中黄 30 等优良大豆品种及大豆间套种技术的推广应用有效增加了农田产出率,提高了资源利用率,对振兴甘肃省大豆产业起到了积极的推动作用。今后,我们将以大豆现代产业技术体系为依托,进一步加大力度,扩大技术覆盖面,大力推广优良品种,将甘肃大豆生产提升到一个新水平。”