

张超, 邓勇, 黄思齐, 等. 红麻亚硝酸还原酶基因 *HcNiR* 的克隆与表达分析 [J]. 福建农业学报, 2022, 37 (5): 600–608.

ZHANG C, DENG Y, HUANG S Q, et al. Cloning and Expression of Nitrite Reductase Gene *HcNiR* in Kenaf [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2022, 37 (5): 600–608.

红麻亚硝酸还原酶基因 *HcNiR* 的克隆与表达分析

张超^{1,2}, 邓勇², 黄思齐², 伍应保¹, 张高阳¹, 满百膺¹, 李德芳^{2*}

(1. 上饶师范学院生命科学学院, 江西 上饶 334001; 2. 中国农业科学院麻类研究所, 湖南 长沙 410205)

摘要:【目的】了解红麻亚硝酸还原酶基因 *HcNiR* 生物信息学特性及组织表达特异性, 为培育红麻氮高效利用品种提供理论依据。【方法】以红麻材料 349 叶片的 cDNA 为模板, 利用 PCR 扩增 *HcNiR* 基因的 CDS 序列, 采用生物信息学方法分析 *HcNiR* 的氨基酸组成、蛋白质跨膜结构、信号肽、高级结构以及蛋白的同源进化树; 采用实时荧光定量 PCR 检测 *HcNiR* 基因在红麻不同组织的表达情况。【结果】*HcNiR* 基因 cDNA 全长 1395 bp, 编码蛋白含有 464 个氨基酸, 包含 2 个保守的亚硝酸和亚硫酸还原酶 4Fe-4S 结构域及铁氧蛋白部分结构域。*HcNiR* 蛋白是一个不含跨膜转运结构与信号肽的亲水稳定性蛋白质, 该蛋白质等电点是 5.49, 分子量 51.68 kDa; 具有 26 处潜在磷酸化位点。在其蛋白二级结构中, α -螺旋和无规则卷曲所占比例超过 70%。通过氨基酸序列同源性分析发现, 红麻 *HcNiR* 氨基酸序列与木槿 *HsNiR* 氨基酸序列相似性较高, 达到 97.37%, 都含有铁-硫/铁血红素结合位点。进化树分析结果表明, 红麻 *HcNiR* 基因与木槿 *HsNiR* 基因亲缘关系较近。组织特异性表达结果显示, 红麻 *HcNiR* 基因在叶中的表达量高于根。【结论】*HcNiR* 基因编码蛋白含亚硝酸和亚硫酸还原酶 4Fe-4S 结构域及铁氧蛋白部分结构域; *HcNiR* 基因具有组织表达特异性, 在红麻叶片中表达较高, 推测其主要在初级氮的同化过程中发挥重要调控作用。

关键词: 红麻; 亚硝酸还原酶; *HcNiR* 基因; 基因克隆; 表达分析

中图分类号: S 563.5

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2022) 05-0600-09

Cloning and Expression of Nitrite Reductase Gene *HcNiR* in Kenaf

ZHANG Chao^{1,2}, DENG Yong², HUANG Siqi², WU Yingbao¹, ZHANG Gaoyang¹, MAN Baiying¹, LI Defang^{2*}

(1. College of Life Science, Shangrao Normal University, Shangrao, Jiangxi 334001, China; 2. Institute of Bast Fiber Crops, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changsha, Hunan 410205, China)

Abstract: 【Objective】Bioinformatics and expressions of the nitrate reductase gene of kenaf (*Hibiscus cannabinus*) were studied for breeding varieties highly efficient in nitrogen utilization. 【Method】From the leaf of kenaf 349, the coding sequences (CDS) of *HcNiR* was amplified by PCR. Bioinformatics method was applied to analyze the amino acid sequences, protein transmembrane structure, protein signal peptide, high-level structures, and homologous evolutionary tree associated with the gene, while the expression in various tissues detected by qRT-PCR. 【Result】The full length of *HcNiR* cDNA was 1395 bp encoded 464 amino acids. The amino acid sequence contained two conserved nitrite and sulfite reductase 4Fe-4S domains and two conserved nitrite/sulfite reductase ferredoxin-like half domains. The predicted stable, hydrophilic *HcNiR* protein with an isoelectric point of 5.49 and molecular weight of 51.68 kDa had no transmembrane domain or signal peptide. It contained 26 potential phosphorylation sites in a secondary structure that consisted of more than 70% in the forms of α helix and irregular coils. The amino acid sequence of *HcNiR* was 97.37% homologous with that of *H. syriacus*, and both included nitrite and sulfite reductases iron-sulfur/siroheme-binding sites. The phylogenetic tree on *HcNiR* showed it closely related to *HsNiR*. The *HcNiR* expression was higher in the leaves than in the roots of a kenaf plant. 【Conclusion】*HcNiR* contained two

收稿日期: 2021-10-29 初稿; 2022-01-08 修改稿

作者简介: 张超 (1985-), 男, 博士, 讲师, 主要从事麻类遗传育种研究 (E-mail: zhangchao_20180604@163.com)

* 通信作者: 李德芳 (1962-), 男, 博士, 研究员, 主要从事一年生麻类遗传改良研究 (E-mail: chinakenaf@126.com)

基金项目: 江西省教育厅科学技术项目 (GJJ180890); 国家麻类产业技术体系红麻品种改良项目 (CARS-16-E05); 中国农业科学院科技创新工程一年生麻类育种项目 (ASTIP-IBFC03)

conserved nitrite and sulfite reductase 4Fe-4S domains and two conserved nitrite/sulfite reductase ferredoxin-like half domains. The gene was abundantly expressed in the kenaf leaves and speculated to be mainly involved in the process of primary nitrogen assimilation.

Key words: kenaf; nitrate reductase; *HcNiR*; gene cloning; expression analysis

0 引言

【研究意义】红麻 (*Hibiscus cannabinus* L.) 为锦葵科木槿属一年生韧皮纤维作物, 其经济价值不仅仅体现于纤维利用, 在材料、生物能源、医用、饲料、造纸及碳汇交易等多方面都具有重要的研究前景^[1-3]; 在生产实践中发现红麻具有生长速度快、生物量大等特点, 作为畜禽饲料的价值也尤为突出: 红麻生长速度快, 叶片中含黄酮和多酚, 抗虫能力强, 无需施药, 属于天然绿色蛋白饲料^[4]。近年来国内畜牧业飞速进步, 饲料产业一跃而起, 如何提高饲料的品质成为关键问题^[5]。亚硝酸还原酶 *NiR* (Nitrite reductase) 是植物硝态氮同化过程中重要的酶。植物从土壤里摄取氮素一般可以分为两种形式, 一种是以硝态氮形式进入植物体中, 该形式必须首先经历一个还原过程方可被同化为有机含氮化合物; 而另一种是以氨态氮形式进入植物体后, 直接被结合成含氮的有机物。亚硝酸还原酶 *NiR* 与硝酸还原酶 (Nitrate reductase, *NR*) 偶联完成 NO_3^- 无机同化^[6], 继而 NO_2^- 进一步被 *NiR* 还原酶还原成 NH_4^+ , 该酶在硝酸盐降解并生成铵的过程中起承前启后的作用。硝酸还原酶是 NO_3^- 无机同化步骤中的第一个酶, 也是整个过程的限速酶, 而亚硝酸还原酶是 NO_3^- 无机同化的控制酶, 两个酶偶联完成 NO_3^- 的无机同化^[7,8]。本研究通过克隆红麻亚硝酸还原酶基因 *HcNiR*, 研究其编码蛋白的生物信息学与表达特性, 对了解红麻氮代谢调控机制及生物学功能具有重要意义。【前人研究进展】相对于硝酸还原酶 *NR*, 亚硝酸还原酶 *NiR* 相关的研究并不多见, 其生物学功能也未明确。Lahners 等^[9]对 *ZmNiR* 基因结构进行研究, 并获得该基因的分子结构, 其氨基酸序列与菠菜序列相比有 86% 的相似性, 该基因参与对氮吸收的调节。Wang 等^[10]通过研究拟南芥根中硝酸盐诱导的结果, 发现在氮饥饿的条件下, 由于硝酸盐量的增加, 亚硝酸还原酶 mRNA 也具有了较高的表达量。Takahashi 等^[11]将菠菜亚硝酸还原酶 *NiR* 基因导入拟南芥中得出, *NiR*-mRNA 与 *NiR* 的总蛋白含量 ($r=0.74$)、*NiR* 总蛋白与 *NiRA* ($r=0.71$)、*NiRA* 与通过分析 NO_2^- 产生的还原氮同化 NO_2^- ($r=$

0.65) 均呈显著正相关, 结果证实 *NiR* 为植物无机氮循环中 NO_2^- 同化部分的控制酶; Kato 等^[12]等研究发现烟草中含有 4 个不同的 *NiR* 基因, 且在叶片和根系中均有表达, 且与氮吸收相关。Ozawa 等^[13]克隆一个水稻的 *NiR* 基因, 将该基因在水稻品种越光中过量表达, 提高了其愈伤组织的生长及再生能力, 可作为农业转基因水稻高产的选择系统。夏磊等^[14]克隆了黄瓜亚硝酸还原酶基因 *CsNiR*, 研究发现其活性与外植体分化率表现出负相关关系。【本研究切入点】本课题组前期研究中利用不同蛋白含量饲用红麻叶片转录组与蛋白组测序联合分析得到红麻亚硝酸还原酶关键基因 *HcNiR*, 根据其基因序列设计引物克隆该基因。但其作为亚硝酸还原酶基因功能还未被确定, 在生物信息学方面仍有较多值得挖掘的地方。【拟解决的关键问题】克隆红麻 *HcNiR* 基因并对该基因进行生物信息学分析和组织特异性表达分析, 为进一步研究该基因在红麻氮代谢调控机制及培育红麻氮高效利用品种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

供试红麻材料 349 由中国农业科学院麻类研究所一年生麻类作物育种团队提供, 该材料在 70 多个具有代表性的红麻材料中经多年试验得出, 其叶片具有较高的粗蛋白含量 (27.36%)^[15]; 主要试剂: KOD-FX 高保真酶 [东洋纺 (上海) 生物科技有限公司], GoldenstarTM RT6 cDNA Synthesis Kit (北京擎科新业生物技术有限公司), 零背景 pTOPO-TA/Blunt Simple 克隆试剂盒 (北京艾德莱生物技术有限公司), PC33-2xSybr Green qPCR Mix (北京艾德莱生物技术有限公司)。

1.2 红麻叶片总 RNA 提取

取萌发后培养 45 d 长势良好的红麻叶片约 100 mg, 液氮中快速研磨成微小粉末状, 红麻叶片 RNA 提取步骤按照 EASY spinPlus 多糖多酚复杂植物总 RNA 快速提取试剂盒说明书操作, 13 μL 预处理 DEPC 水溶解, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测提取 RNA 是否完整。

1.3 *HcNiR* 基因引物设计

根据 *HcNiR* 基因序列设计引物 (表 1), 内参基因 *beta-actin* 选择参考文献 [16]。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

引物名称 Primer names	引物序列 (5'-3') Primer sequence(5'-3')
<i>HcNiR</i> -F	ATGACAGATGGGAGATTATGATG
<i>HcNiR</i> -R	GCATTTTCCACTTCTTCTTCCC
<i>HcNiR</i> -qPCR-F	TCTTGTTACAGGGGCAATAGAC
<i>HcNiR</i> -qPCR-R	TGGACACCAAGATAGTCTCTCCT
<i>beta-actin</i> -F	ATCCTCCGTCTTGACCTTG
<i>beta-actin</i> -R	TGTCCGTCAGGCAACTCAT

1.4 目的基因 PCR 扩增

以红麻叶片总 RNA 反转录成 cDNA, 扩增红麻 *HcNiR* 基因 cDNA 全长序列, PCR 反应体系为 25 μL : cDNA 1 μL , $2\times\text{PCR Buffer}$ 12.5 μL , dNTPs (2 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$) 5 μL , KOD FX (1 U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 1 μL , 上游引物 *HcNiR*-F 1 μL , 下游引物 *HcNiR*-R 1 μL , ddH₂O 补至 25 μL 。扩增程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 32 个循环反应 (94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 变性, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 复性, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 min 延伸), 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存 PCR 产物。引物合成及测序工作由北京擎科生物有限公司完成。

1.5 目的片段与载体的连接与转化

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后回收目的 DNA 片段, 加入溶胶液彻底溶解后进行胶回收, 连接到 T 载体, 利用冻融法转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 并均匀涂布于含氨苄青霉素抗性的 LB 固体培养基上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 14 h 左右。挑取白色单菌落, 摇菌待菌液完全浑浊后作菌液 PCR 鉴定并测序。

1.6 生物信息学分析

利用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 预测蛋白结构域, 利用 TMHM Server v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 预测蛋白跨膜结构; 利用 Signal IP 工具 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测信号肽; Protscale 模体数据库 (<https://web.expasy.org/protscale/>) 分析蛋白质产物疏水性和亲水性; 利用 NetPhos 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 预测磷酸化位点; 利用 ExPASy 软件 ProtParam 程序 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析氨基酸序列特性; ProtComp v. 9.0 数据库 (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>) 预测蛋白亚细胞定位;

SOPMA 和 Phyre (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/>) 软件依次预测蛋白质二级及三级结构; 且从 NCBI 中收集已知各物种 *NiR* 基因序列, 利用 ClustalX 比对蛋白质序列, MEGA7.0 软件设置以邻接法用于构建 *HcNiR* 基因与其他物种 *NiR* 基因系统进化树^[17]。

1.7 组织特异性分析

将低温保存的红麻种子用 75% 酒精清洗并擦干, 种子放置于发芽盒中, 25 $^{\circ}\text{C}$ 萌发 7 d 转入温室水培。生长条件设定: 昼夜温度 25/20 $^{\circ}\text{C}$, 光周期 16/8 h (光/暗), 相对湿度 60%, 光强度 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$, 1/4 Hoagland 营养液, 两天更换一次。培养 45 d 后取红麻叶片、根部分组织。提取红麻总 RNA, 使用金牌逆转录试剂盒 (北京擎科生物有限公司, 北京) 反转录合成 cDNA, 选取 *beta-actin* 作为内参基因; 以各样品的 cDNA 为模板, 根据 PC33-2xSybr Green qPCR Mix 说明书在实时定量 PCR 仪 (BIO-RAD CFX96) 上进行实时荧光定量 PCR, 检测不同组织 *HcNiR* 基因在转录水平上的相对表达水平, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 算法计算相对表达量。

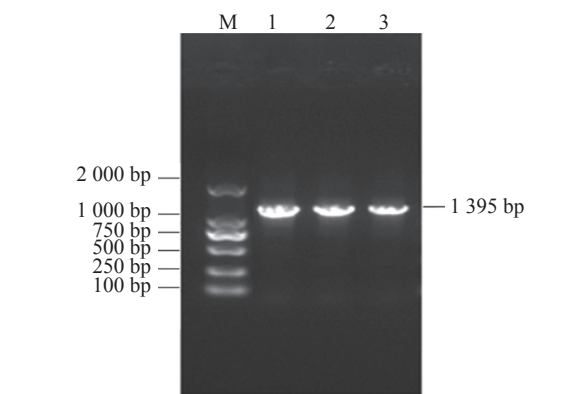
2 结果与分析

2.1 *HcNiR* 基因克隆和序列特征

基于红麻叶片转录组与蛋白组联合分析数据, 设计特异性引物扩增红麻 *HcNiR* 基因的 cDNA 序列, 结果获得一条大小约 1500 bp 的扩增产物, 与预期大小一致 (图 1)。测序结果显示, 该基因含有一个 1395 bp 的开放阅读框 (ORF), 编码 464 个氨基酸。用 SMART 软件对红麻 *HcNiR* 蛋白进行序列分析, 分析结果如图 2, *HcNiR* 氨基酸序列中包含 2 个保守的亚硝酸和亚硫酸还原酶 4Fe-4S 结合域 (Nitrite and sulphite reductase 4Fe-4S domain) 分别位于 74~234 aa 和 335~459 aa, 同时还具有 2 个亚硝酸/亚硫酸还原酶铁氧蛋白结构域蛋白部分结构域 (Nitrite/Sulfite reductase ferredoxin-like half domain), 分别位于 1~66 aa 和 257~323 aa。

2.2 红麻 *HcNiR* 基因编码蛋白的亲/疏水性分析

运用 ProtScale 工具分析红麻 *HcNiR* 基因编码的蛋白质产物亲水性和疏水性, 从分析结果可见, 亲水性分析中, 在多肽链第 249 位的谷氨酸处产生最大峰值, 对应峰数值-3.200; 疏水性分析中, 在多肽链第 444 位的丙氨酸处产生最大峰值, 对应峰数值 2.456。根据氨基酸分值越高疏水性越强和分值越低亲水性越强的规律, 亲水性最强的氨基酸是该基因序列第 249 位的谷氨酸, 疏水性最强的氨基酸是该



M-DL2000 DNA Marker; 1 为 *HcNiR*-1, 2 为 *HcNiR*-2, 3 为 *HcNiR*-3。
M: DL2000 DNA marker; 1: *HcNiR*-1; 2: *HcNiR*-2; 3: *HcNiR*-3。
图 1 *HcNiR* 基因克隆的琼脂糖凝胶电泳检测结果
Fig. 1 Gel electrophoresis of *HcNiR* cloning result

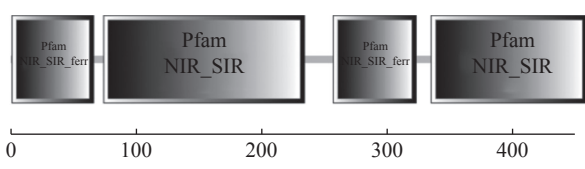


图 2 *HcNiR* 蛋白保守结构域的预测
Fig. 2 Predicted conserved domain of *HcNiR* protein

基因序列第 444 位的丙氨酸。从整体上看，亲水性氨基酸多于疏水性氨基酸，且均匀分布在肽链中；推测 *HcNiR* 基因编码的蛋白质是亲水性蛋白（图 3）。

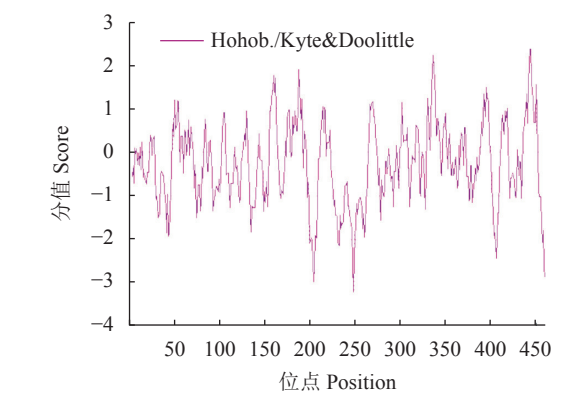
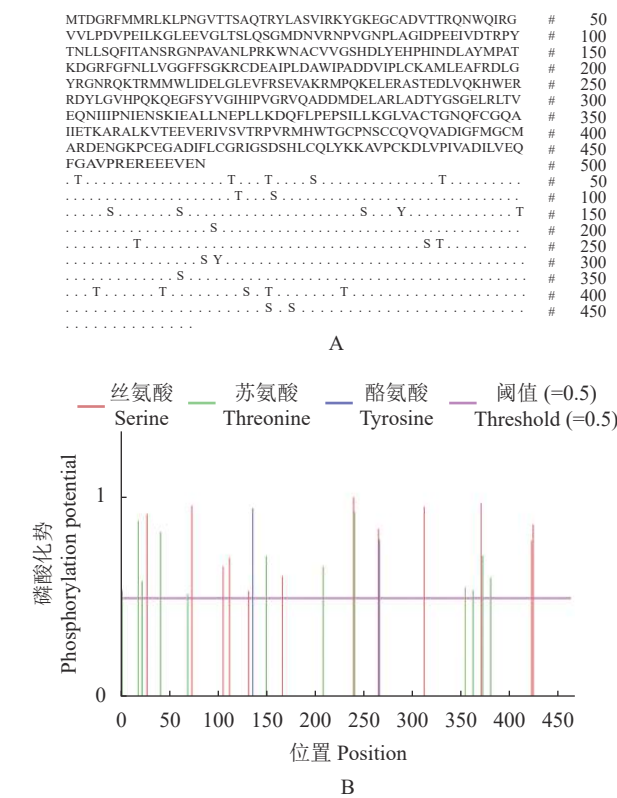


图 3 *HcNiR* 蛋白质亲水和疏水性分析
Fig. 3 Hydrophilicity and hydrophobicity of *HcNiR* protein

2.3 *HcNiR* 蛋白质磷酸化位点预测分析

以神经网络算法为基础预测蛋白质磷酸化位点，*HcNiR* 基因编码蛋白质的可能磷酸化位点如图 4-A 所示；结果可知，*HcNiR* 蛋白存在 12 个丝氨酸磷酸化位点（分别是 27、73、105、112、132、166、239、265、312、370、422 和 424）、12 个苏氨酸磷酸化位点（分别是 2、18、22、41、69、150、208、240、354、362、372 和 380）以及 2 个潜在的酪氨酸磷酸化位点（分别是 136 和 266），相对应的



A 为潜在磷酸化位点；B 为磷酸化势。
A: Potential phosphorylation site; B: Phosphorylation potential.
图 4 *HcNiR* 蛋白潜在磷酸化位点预测结果
Fig. 4 Predicted phosphorylation sites in *HcNiR* protein

磷酸化势见图 4-B，表明 *HcNiR* 蛋白可能被这 3 种氨基酸激酶磷酸化且激活，最终调控基因表达。

2.4 红麻 *HcNiR* 基因编码蛋白质产物一级结构分析

红麻 *HcNiR* 基因编码蛋白质产物一级结构分析预测结果见表 2，由结果可知，该蛋白质不稳定系数 37.930，低过阈值 40。*HcNiR* 蛋白是稳定酸性亲水蛋白质。利用 ProtComp 预测 *HcNiR* 蛋白的亚细胞定位，该蛋白定位于叶绿体上。

2.5 红麻 *HcNiR* 基因编码蛋白质产物二级结构及高级结构预测

运用 SOPMA 软件分析红麻 *HcNiR* 基因编码的蛋白质产物二级结构，从分析结果可知（图 5），*HcNiR* 蛋白二级结构由 α 螺旋、不规则卷曲、 β 折叠及 β 转角组成。其中， α 螺旋占 35.99%，不规则卷曲占 41.81%， β 折叠占 16.81%， β 转角占 5.39%。利用跨膜预测服务运用 Phyre2 数据库在线分析 *HcNiR* 基因编码的蛋白质产物并预测分析蛋白质三级结构，运用 Rasmol 软件分析红麻 *HcNiR* 基因编码的蛋白质产物三级结构，并以图形化分析。从分析数据中可得到，*HcNiR* 基因编码的蛋白质产物三级结构中含 α 螺旋 25 个，氢键 286 个， β 折叠 36 个，转角 43 个（图 6）。

表 2 *HcNiR* 基因编码蛋白质产物一级结构预测分析
Table 2 Primary structure of *HcNiR* encoded protein

一级结构特征 Characteristics of primary structure	氨基酸数量 Number of amino acids	等电点 pI	相对分子质量 Relative molecular mass/Da	分子式 Molecular formula	正电荷 残基 Arg+Lys	负电荷 残基 Asp+Glu	平均疏水性 Average hydrophobicity	脂肪系数 (A1) Fatty coefficient	不稳定系数 (II) Instability coefficient (II)	半衰期 Estimated half-life/h
预测结果 Prediction result	464	5.490	51 683.220	C ₂₂₇₆ H ₃₆₃₂ N ₆₄₄ O ₆₈₁ S ₂₄	54	64	-0.289	89.480	37.930	30

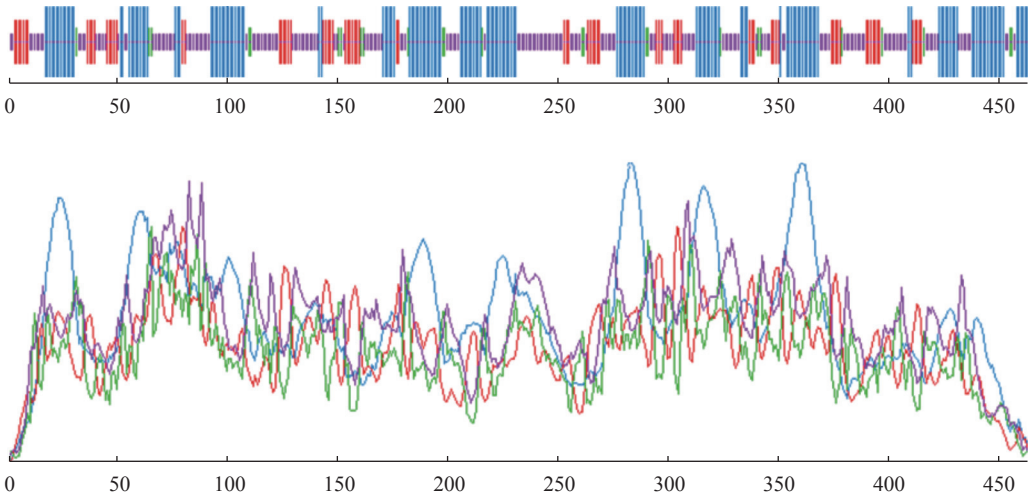


图 5 红麻 *HcNiR* 基因编码的蛋白产物二级结构
Fig. 5 Secondary structure of *HcNiR* encoded protein

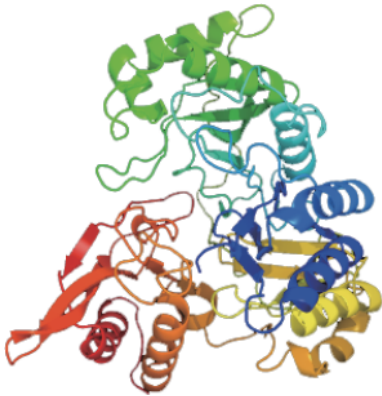


图 6 *HcNiR* 基因编码蛋白质产物的三级结构
Fig. 6 Tertiary structure of *HcNiR* encoded protein

2.6 *HcNiR* 编码蛋白质的跨膜结构及信号肽分析

利用跨膜预测服务器 TMHMM Server 2.0 分析 *HcNiR* 基因编码蛋白质的跨膜结构 (图 7), 分析结果表明其氨基酸在膜外区域几率比较接近于 1, 而在膜内区域几率非常低, 存在跨膜区域的几率也比较低。所以推测 *HcNiR* 蛋白 464 个氨基酸残基几乎完全在膜外且无明显跨膜区域。因而可知 *HcNiR* 蛋白并无跨膜转运信号, 同样也不是膜上受体。通常由 5~30 个氨基酸残基组成的一个蛋白质片段称为信号肽。 *HcNiR* 蛋白质信号肽预测结果可知 (图 8), 其氨基酸序列中并不含有信号肽。

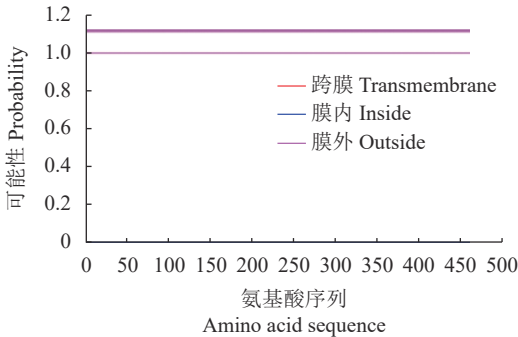


图 7 *HcNiR* 跨膜结构预测
Fig. 7 Predicted transmembrane structure of *HcNiR*

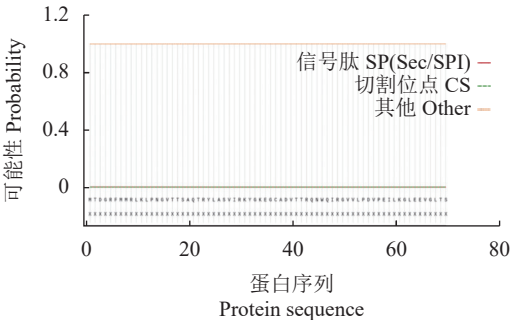


图 8 *HcNiR* 信号肽预测
Fig. 8 Predicted signal peptide of *HcNiR*

2.7 红麻 *HcNiR* 的同源性分析与系统进化树分析

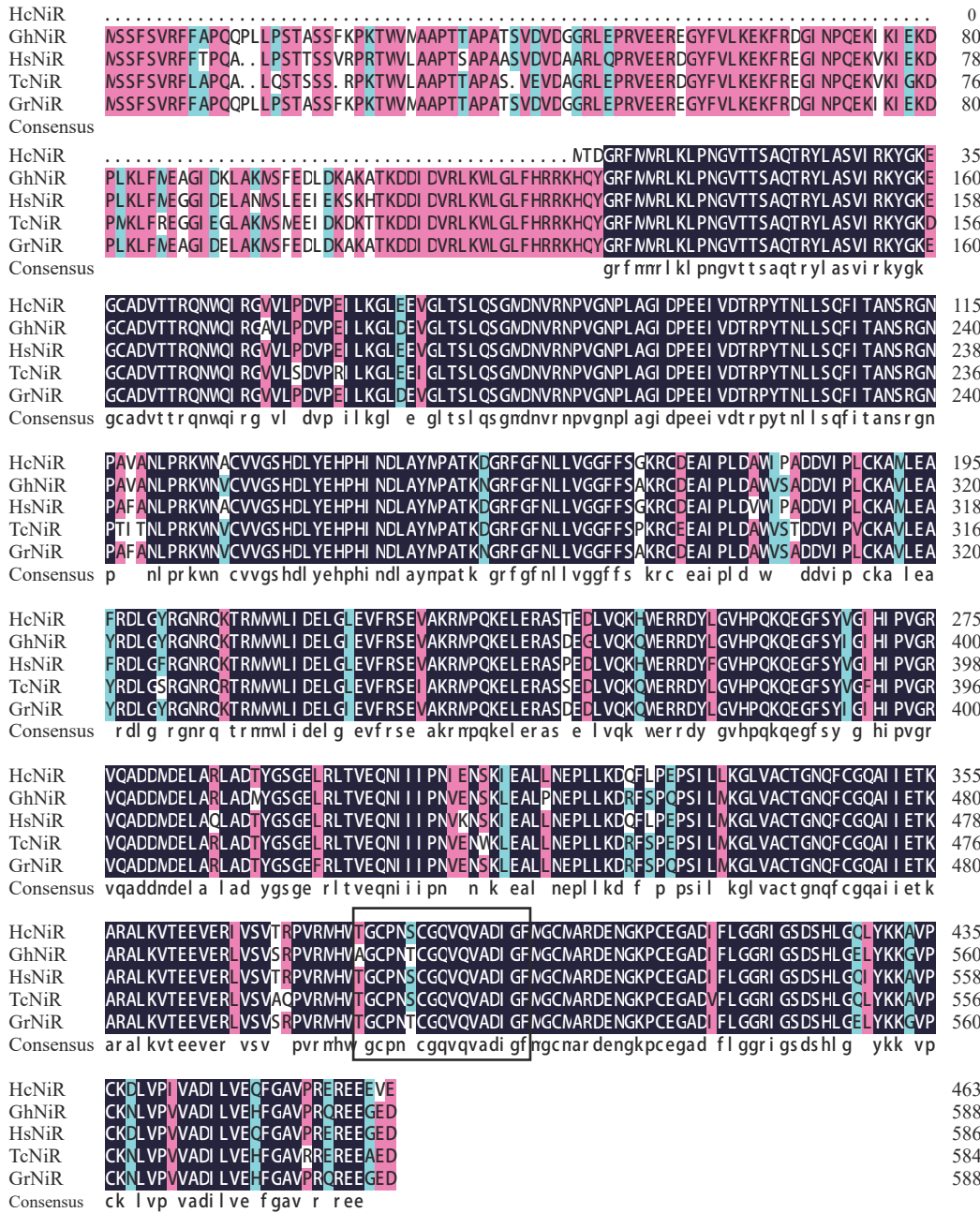
BlastP 程序对 *HcNiR* 464 个氨基酸与其他物种中

NiR 氨基酸序列进行同源性比对，由结果（图 9）可知，红麻 *HcNiR* 与木槿（XP_039006864.1）、雷蒙德氏棉（XP_012463711.1）、陆地棉（ADJ68001.1）和可可树（XP_007042430.2）的相似度分别为 97.37%、93.65%、93.00% 和 92.12%。对红麻 *HcNiR* 蛋白序列分析发现，其存在由 17 个氨基酸组成的铁-硫/铁血红素结合位点“TGCPNSCGVQVADIGF”。使用 MEGA7.0 对来自 12 种植物的 *HcNiR* 氨基酸序列绘

制 NJ（Neighbor-joining 法）系统进化树（图 10），结果表明，红麻 *HcNiR* 与木槿 *HsNiR*（*Hibiscus syriacus*）聚在同一分枝，亲缘关系较近；雷蒙德氏棉 *GrNiR*（XP_012463711.1）、陆地棉 *GhNiR*（ADJ68001.1）与 *HcNiR* 距离也相对较近。红麻 *HcNiR* 蛋白与可可树 *TcNiR*（XP_007042430.2）蛋白聚成一支。

2.8 *HcNiR* 基因在红麻不同组织中的表达分析

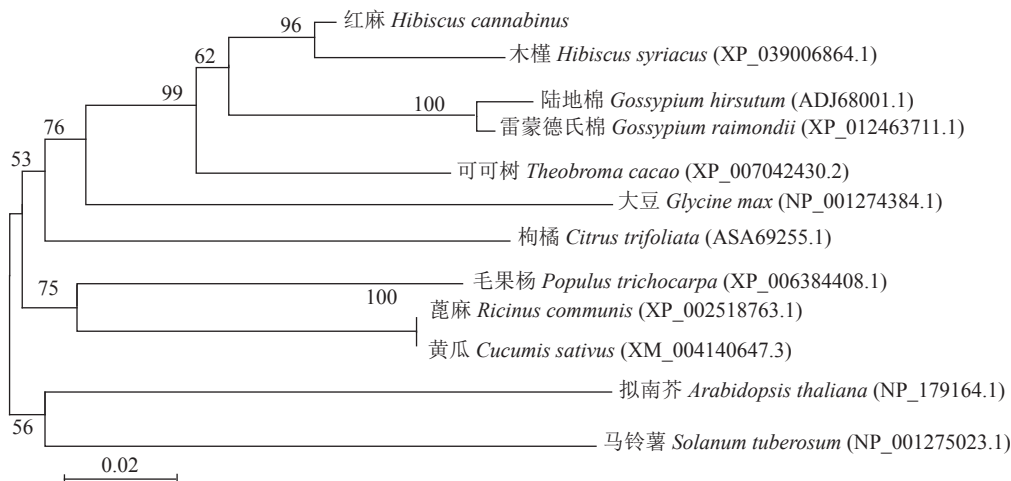
以红麻叶、根 cDNA 为模板，以 *HcNiR*-qPCR-



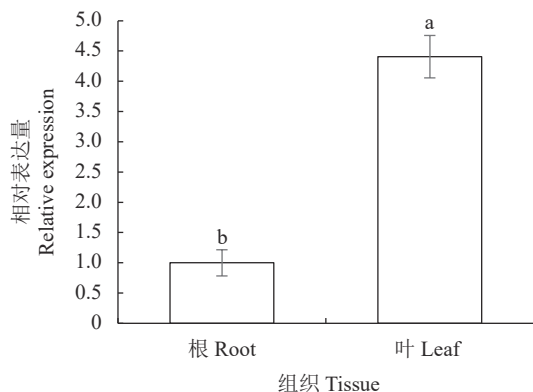
HcNiR: 红麻; HsNiR: 木槿 (XP_039006864.1); TcNiR: 可可树 (XP_007042430.2); GhNiR: 陆地棉 (ADJ68001.1); GrNiR: 雷蒙德氏棉 (XP_012463711.1)。

HcNiR: *H. cannabinus*; HsNiR: *H. syriacus* (XP_039006864.1); TcNiR: *Theobroma cacao* (XP_007042430.2); GhNiR: *Gossypium hirsutum* (ADJ68001.1); GrNiR: *Gossypium raimondii* (XP_012463711.1)。

图 9 *HcNiR* 的氨基酸序列对比
Fig. 9 Amino acid sequences of *HcNiR*

图 10 *HcNiR* 基因同源进化树比对Fig. 10 Homologous evolutionary trees of *HcNiR*

F 和 *HcNiR*-qPCR-R 为引物, *beta-actin* 为内参引物进行实时荧光定量 PCR 反应, 检测不同组织中 *HcNiR* 基因的相对表达量。Real time PCR 结果表明其在红麻不同器官中(叶、根)中均有表达, 在叶中的相对表达量显著高于根 ($P < 0.05$) (图 11)。



不同小写字母表示不同组织间差异显著 ($P < 0.05$)。

Data with different lowercase letters indicate significant difference at $P < 0.05$.

图 11 *HcNiR* 在不同组织中的表达情况Fig. 11 Expressions of *HcNiR* in various tissues

3 讨论

植物体中氮同化需要在不同氮代谢酶的参与下进行, 由 NO_3^- 还原成 NH_4^+ 这一代谢过程需要由硝酸还原酶和亚硝酸还原酶联合完成; NR 和 NiR 都与光合作用有着极为密切的联系, 其中 NR 是光诱导酶, 并且 NADH 提供还原力是保证硝酸还原反应顺利完成的必要条件^[18], 而 NADH 正是由光反应产生的 NADPH 转换得来; NiR 需要光反应中产生的铁氧还蛋白 (Fd) 才能够完成还原反应^[19], 并将 NO_2^- 还原成 NH_4^+ 。本研究中克隆到红麻 NiR 基因, 其目的条

带长度为 1395 bp, 共编码 464 个氨基酸, 同时包含保守的亚硝酸和亚硫酸还原酶 4Fe-4S 结构域及亚硝酸/亚硫酸还原酶铁氧蛋白部分结构域。小麦 *TaNiR* 基因也含有 4 个保守的参与铁硫蛋白簇 (4Fe-4S) 结构域及铁氧还蛋白结合位点^[20]。NiR 基因在拟南芥、水稻、菠菜、烟草等植物中克隆得到^[21] 的氨基酸序列中也都含有铁氧还蛋白亚硝酸盐还原酶结构域。

提取红麻总 RNA 进行 *HcNiR* 基因组织特异表达定量分析时, 选择 45 d 的叶片和根组织, 此时麻苗正处在旺长期, 各组织基因表达量均衡且较高。铁氧化还原蛋白 (Fd) 依赖的亚硝酸还原酶不仅存在于叶绿体中, 根等非光合组织中也有发现^[22]。本试验中对红麻 *HcNiR* 基因亚细胞定位的结果发现该基因主要存在于叶绿体中; 从组织表达分析得到, *HcNiR* 基因在叶中表达量较高, 明显高于根。张芬等^[23] 研究了茶树亚硝酸还原酶基因及其表达特性, 发现该基因在成熟叶片中表达量高于一芽二叶和根; 孙菲菲等^[24] 研究发现白菜亚硝酸还原酶基因叶片中的表达量远高于根表达量, 证明叶与根中的确存在 NiR 基因的表达, 且在叶中的表达量高于根, 本研究结果与二者的研究结果相符。

植物中亚硝酸还原酶基因表达规律与各类内在、外在因素有关。张芬等^[23] 研究了不同供氮水平茶树叶片中亚硝酸还原酶基因 *NiR* 表达特性, 石晓艳等^[25] 研究了甜菜亚硝酸还原酶基因 *NiR* 在不同 NO_3^- -N 和 NH_4^+ -N 浓度对甜菜叶片 *NiR* 基因表达的影响, 孙菲菲等^[24] 研究了不同 NO_3^- -N 和 NH_4^+ -N 浓度对白菜根和叶片 *BpNiR* 基因表达的影响。陈何等^[26] 研究苋菜亚硝酸还原酶基因 *NiR* 对不同硝酸铵含量配比与红蓝复合光配比的共同调控氮代谢。本研究

结果有助于深入研究 *HcNiR* 基因在红麻硝态氮同化过程中的关键作用，提高氮的转化效率，能够为种质资源鉴定、培育氮红麻高蛋白品种提供分子生物学理论依据；但还需通过亚细胞定位、诱导蛋白及红麻遗传转化等技术进一步对基因结构与功能进行验证。

综上，*HcNiR* 基因编码蛋白含有 2 个保守的亚硝酸和亚硫酸还原酶 4Fe-4S 结构域及 2 个保守亚硝酸/亚硫酸还原酶铁氧蛋白部分结构域，与其他植物 *NiR* 在生物学功能上具有一致性；*HcNiR* 基因具有组织表达特异性，在红麻叶片中高效表达，推测其主要在初级氮的同化过程中发挥重要调控作用。

参考文献：

- [1] ZHANG L W, XU Y, ZHANG X T, et al. The genome of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) provides insights into bast fibre and leaf shape biogenesis [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18 (8) : 1796–1809.
- [2] AYADI R, HANANA M, MZID R, et al. *Hibiscus cannabinus* L.-kenaf: A review paper [J]. *Journal of Natural Fibers*, 2017, 14 (4) : 466–484.
- [3] 陶爱芬, 张晓琛, 祁建民. 红麻综合利用研究进展与产业化前景 [J]. *中国麻业科学*, 2007, 29 (1) : 1–5.
TAO A F, ZHANG X C, QI J M. Research progress and industrialization prospect of comprehensive utilization on kenaf [J]. *Plant Fiber Sciences in China*, 2007, 29 (1) : 1–5. (in Chinese)
- [4] SWINGLE R S, URIAS A R, DOYLE J C, et al. Chemical composition of kenaf forage and its digestibility by lambs and *in vitro* [J]. *Journal of Animal Science*, 1978, 46 (5) : 1346–1350.
- [5] 李超显. 饲料产业的环保问题及解决对策 [J]. *中国饲料*, 2019 (18) : 114–117.
LI C X. Environmental protection problems and solutions in feed industry [J]. *China Feed*, 2019 (18) : 114–117. (in Chinese)
- [6] SEITH B, SCHUSTER C, MOHR H. Coaction of light, nitrate and a plastidic factor in controlling nitrite-reductase gene expression in spinach [J]. *Planta*, 1991, 184 (1) : 74–80.
- [7] ZHANG J, LV J, XIE J M, et al. Nitrogen source affects the composition of metabolites in pepper (*Capsicum annuum* L.) and regulates the synthesis of capsaicinoids through the GOGAT-GS pathway [J]. *Foods (Basel, Switzerland)*, 2020, 9 (2) : 150.
- [8] KYAING M, 顾立江, 程红梅. 植物中硝酸还原酶和亚硝酸还原酶的作用 [J]. *生物技术进展*, 2011, 1 (3) : 159–164.
KYAING M, GU L J, CHENG H M. The role of nitrate reductase and nitrite reductase in plant [J]. *Current Biotechnology*, 2011, 1 (3) : 159–164. (in Chinese)
- [9] LAHNERS K, KRAMER V, BACK E, et al. Molecular cloning of complementary DNA encoding maize nitrite Reductase: Molecular analysis and nitrate induction [J]. *Plant Physiology*, 1988, 88 (3) : 741–746.
- [10] WANG R C, XING X J, CRAWFORD N. Nitrite acts as a transcriptome signal at micromolar concentrations in *Arabidopsis* roots [J]. *Plant Physiology*, 2007, 145 (4) : 1735–1745.
- [11] TAKAHASHI M, SASAKI Y, IDA S, et al. Nitrite reductase gene enrichment improves assimilation of NO₂ in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2001, 126 (2) : 731–741.
- [12] KATO C, TAKAHASHI M, SAKAMOTO A, et al. Differential expression of the nitrite reductase gene family in tobacco as revealed by quantitative competitive RT-PCR [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55 (403) : 1761–1763.
- [13] OZAWA K, KAWAHIGASHI H. Positional cloning of the nitrite reductase gene associated with good growth and regeneration ability of calli and establishment of a new selection system for *Agrobacterium*-mediated transformation in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Plant Science*, 2006, 170 (2) : 384–393.
- [14] 夏磊, 王团团, 段莉莉, 等. 黄瓜亚硝酸还原酶基因 (*CsNiR*) 的克隆及对外植体分化的影响 [J]. *南京农业大学学报*, 2020, 43 (2) : 231–237.
XIA L, WANG T T, DUAN L L, et al. Cloning of nitrite reductase gene (*CsNiR*) in cucumber and its effect on explant differentiation [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2020, 43 (2) : 231–237. (in Chinese)
- [15] 张超, 黄思齐, 邓勇, 等. 高蛋白饲用红麻品种筛选及饲用品质研究 [J]. *中国麻业科学*, 2021, 43 (6) : 287–293.
ZHANG C, HUANG S Q, DENG Y, et al. Selection of high protein forage kenaf varieties and study on their feed quality [J]. *Plant Fiber Sciences in China*, 2021, 43 (6) : 287–293. (in Chinese)
- [16] 邓勇. 硫化氢缓解红麻重金属镉胁迫功能分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2019.
DENG Y. Function analysis of hydrogen sulfide-mediated alleviation of cadmium stress in kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) seedlings[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2019. (in Chinese)
- [17] 张超, 张勇, 满百膺, 等. 大豆 *GmPID* 基因生物信息学分析及克隆 [J]. *东北农业大学学报*, 2020, 51 (1) : 13–22.
ZHANG C, ZHANG Y, MAN B Y, et al. Bioinformatic analysis and cloning of gene *GmPID* in soybean [J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2020, 51 (1) : 13–22. (in Chinese)
- [18] 田华, 段美洋, 王兰. 植物硝酸还原酶功能的研究进展 [J]. *中国农学通报*, 2009, 25 (10) : 96–99.
TIAN H, DUAN M Y, WANG L. Research progress on nitrate reductase functions in plants [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2009, 25 (10) : 96–99. (in Chinese)
- [19] NAVARRO F J, PERDOMO G, TEJERA P, et al. The role of nitrate reductase in the regulation of the nitrate assimilation pathway in the yeast *Hansenula polymorpha* [J]. *FEMS Yeast Research*, 2003, 4 (2) : 149–155.
- [20] 余茂云, 陈朵朵, 冯晨, 等. 小麦亚硝酸还原酶基因及调控序列克隆、定位和表达分析 [J]. *作物学报*, 2011, 37 (1) : 28–39.
SHE M Y, CHEN D D, FENG C, et al. Isolation, chromosome

- assignment, and expression assay of nitrite reductase gene and regulatory sequence in wheat [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2011, 37 (1) : 28–39. (in Chinese)
- [21] 曾彦达, 石晓艳, 马凤鸣. 甜菜亚硝酸还原酶 (NiR) 基因的克隆与分析 [J]. *东北农业大学学报*, 2012, 43 (1) : 77–82.
- ZENG Y D, SHI X Y, MA F M. Cloning and analysis of *NiR* gene in sugar beet [J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2012, 43 (1) : 77–82. (in Chinese)
- [22] HIRASAWA M, FUKUSHIMA K, TAMURA G, et al. Immunochemical characterization of nitrite reductases from spinach leaves, spinach roots and other higher plants [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1984, 791 (2) : 145–154.
- [23] 张芬, 王丽鸳, 成浩, 等. 茶树亚硝酸还原酶基因 *CsNiR* 的克隆及表达分析 [J]. *园艺学报*, 2016, 43 (7) : 1348–1356.
- ZHANG F, WANG L Y, CHENG H, et al. Molecular cloning and expression analysis of nitrite reductase gene *CsNiR* in tea plant [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2016, 43 (7) : 1348–1356. (in Chinese)
- [24] 孙菲菲, 蒋芳玲, 侯喜林, 等. 白菜亚硝酸还原酶基因 *BcNiR* 的克隆及表达分析 [J]. *园艺学报*, 2009, 36 (10) : 1511–1518.
- SUN F F, JIANG F L, HOU X L, et al. Molecular cloning and characterization of nitrite reductase gene *BcNiR* from non-heading Chinese cabbage [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2009, 36 (10) : 1511–1518. (in Chinese)
- [25] 石晓艳, 曾彦达, 李世龙, 等. 甜菜亚硝酸还原酶 (NiR) 基因的克隆与表达分析 [J]. *作物学报*, 2011, 37 (8) : 1406–1414.
- SHI X Y, ZENG Y D, LI S L, et al. Molecular cloning and characterization of nitrite reductase gene from sugarbeet [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2011, 37 (8) : 1406–1414. (in Chinese)
- [26] 陈何, 王乐, 赵春丽, 等. 氮素和红蓝复合光配比对苋菜幼苗亚硝酸还原酶活性及其基因表达的影响 [J]. *中国农业大学学报*, 2021, 26 (8) : 61–71.
- CHEN H, WANG L, ZHAO C L, et al. Effects of nitrogen and red and blue light on *NiR* enzyme activity and gene expression in *Amaranthus tricolor* L. seedlings [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2021, 26 (8) : 61–71. (in Chinese)

(责任编辑: 张梅)