

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2013.01.016

王琦,冯二艳,王荣,等. RACE 法克隆甜菜 NR 基因及生物信息学分析[J]. 广西植物,2013,33(1):89–95

Wang Q, Feng EY, Wang R, et al. RACE cloning and bioinformatics analysis of nitrate reductase in *Beta vulgaris*[J]. *Guihaia*, 2013, 33(1): 89–95

RACE 法克隆甜菜 NR 基因及生物信息学分析

王琦^{1,2*}, 冯二艳³, 王荣⁴, 任嘉红¹

(1. 长治学院 生物科学与技术系, 山西 长治 046011; 2. 北京师范大学生命科学学院 北京 100875;

3. 重庆大学 生物工程学院, 重庆 400030; 4. 长治卫生学校, 山西 长治 046000)

摘要: 硝酸还原酶是氮素代谢的关键酶和限速酶, 研究硝酸还原酶的功能对提高甜菜的产量具有重要作用。运用 RACE 法克隆出甜菜的硝酸还原酶基因, 并利用生物信息学对甜菜 NR 进行主要结构分析和功能预测, 并使其在拟南芥中表达, 观察根对向重力性应答过程中的弯曲情况。结果表明, 利用 RACE 法克隆得到甜菜 NR cDNA 全长为 2 760 bp; 甜菜 NR 为易溶、亲水性强的蛋白; 二级结构预测结果显示, 甜菜 NR 为混合型蛋白; 甜菜 NR 含有钼辅因子、细胞色素 b5、FAD 及 NADH 结合域, 具有跨膜区域, 但不含有信号肽; 利用拟南芥突变体观察到野生型比突变体的弯曲较快, 暗示甜菜的 NR 基因可能通过调节 NO 积累参与植物向重力性应答。

关键词: 甜菜; 生物信息学; 硝酸还原酶; RACE; 重力

中图分类号: Q71 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2013)01-0089-07

RACE cloning and bioinformatics analysis of nitrate reductase in *Beta vulgaris*

WANG Qi^{1,2*}, FENG Er-Yan³, WANG Rong⁴, REN Jia-Hong¹

(1. Department of Biology Science & Technology, Changzhi University, Changzhi 046011, China; 2. College of Life

Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China; 3. College of Bioengineering, Chongqing University,

Chongqing 400030, China; 4. Changzhi Municipal Health School, Changzhi 046000, China)

Abstract: Nitrate reductase is an important and limited enzyme in nitrogen metabolism. The functional research of nitrate reductase plays a key role in increasing sugar beet(Sb) yields. In this study, SbNR gene was cloned by RACE and its 3D structure and physiological function were analysed by bioinformatics and expressed in *Arabidopsis thaliana* to show the gravity. The results were as follows; the full length of SbNR gene was 2760bp; SbNR was soluble and hydrophobic; secondary structure analyses showed that SbNR belonged to mixed protein; SbNR was a new member of NR family, containing molybdopterin-binding, cytochrome-binding, FAD-binding and NAD-binding domain. It had no signal peptide, but one transmembrane domain in C terminal, and the mutants showed later response to the gravity, and which confirmed that NO involved in plant's gravity.

Key words: *Beta vulgaris*; bioinformatics; nitrate reductase(NR); rapid amplification of cDNA ends(RACE); gravity

糖用甜菜(*Beta vulgaris*)是我国两大糖料作物之一,在我国北方生产中占有重要地位。但近几十

年来,世界各主要甜菜生产国产量停滞,品质有明显的下降趋势。因此,提高甜菜的产量和品质,将成为

* 收稿日期: 2012-03-01 修回日期: 2012-08-02

基金项目: 国家自然科学基金(31100471); 长治学院校级课题(201221)

作者简介: 王琦(1980-),男,山西长治人,在读博士,讲师,主要从事生物化学、分子生物学等教学与研究, (E-mail) wangqiwq@126.com。

* 通讯作者(Author for correspondence)

发展我国糖料作物的一项重要任务。除了作物品种选育落后之外,不合理供应氮素亦是其主因之一(周仁喜,1986;于海彬等,1988;Caboche & Rouze,1990;曲文章等,1992;Zhou & Kleinhofs,1996;陈志英等,2008)。硝酸还原酶(Nitrate Reductase, NR)是植物体内硝酸盐同化的关键酶与限速酶,在氮素代谢中起着重要的作用(宋松泉等,1993)。一氧化氮(NO)是一种广泛存在于动、植物和微生物体内的胞内和胞间信使分子(Besson-Bard *et al.*, 2008),作为一种不稳定的气体自由基,在哺乳动物细胞中,由 NO 合酶催化精氨酸产生。目前关于植物体内 NO 产生的主要途径有两条,其中一条是通过 NR 来产生(Meyer *et al.*, 2005; Modolo *et al.*, 2005),另一条是直接或间接地通过植物体内 L-精氨酸途径来产生(Parihar *et al.*, 2008)。拟南芥中关于 NR 调控 NO 产生及其作为信号分子的研究已经很多,而关于甜菜 NR 对 NO 信号的调节目前鲜有报道。

从多种植物中分离克隆了 NR 基因全长或片段(Hyde *et al.*, 1991;王利群等,2003;Amey *et al.*, 2007;毛伟华等,2007;田华等,2009)。当前,GenBank 里从高等植物、藻类和真菌中已获得的 NR 序列有 60 多个,而且这个数字每年还在增长。针对 NR 基因水平上的研究,主要集中在高等植物和真菌的研究,而有关甜菜 NR 基因克隆也鲜有报道。本文报道了参照 GenBank 上检索到的甜菜 NR 基因 EST 序列和 NR 基因组 DNA 部分序列来设计引物,本文创新点在于首次采用 RACE 法克隆了 NR 的全长 cDNA 序列,并运用生物信息学的手段对 NR 基因及 NR 的结构与生理功能进行了预测,同时在拟南芥中表达,观察根对向重性应答过程中的弯曲情况。理论意义在于从酶分子的结构上揭示甜菜硝酸还原酶的调控机理,为后续的基因功能鉴定和应用提供一些理论参考和依据,进而对甜菜合理施用氮肥、为提高甜菜产量提供理论依据;实践意义在于对改善与防止农业施肥中硝酸盐给地下水带来的严重生态污染有重大意义。

1 材料和方法

1.1 材料

选用甜菜二倍体品种甜研 7 号(Ty7)作为试材。*E. coli* 感受态细胞 JM109(TaKaRa)、pMD18-

T 克隆载体(TaKaRa)、SuperScript III (Invitrogen)、Taq 聚合酶(TaKaRa)、T4 DNA 连接酶(TaKaRa)、3'-RACE Kit(TaKaRa)、5'-RACE Kit(TaKaRa)、RNAase/EcoR I /Pst I /Hind III /BamH I /Dra I (TaKaRa)、质粒提取 Kit(TaKaRa)、DNA Marker (DL2000,DL15000)(Invitrogen)、转基因受体为拟南芥野生生态型 Col-0、拟南芥 *nia1nia2* 双突变体、拟南芥 *Atnoal1/rif1* 突变体、pCambia1302 表达载体(TaKaRa)、农杆菌菌株为 GV3101(本实验室保存)、琼脂糖(Amersco);引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成,其它试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 甜菜总 RNA 的提取及 RACE 法克隆目的基因片段 从 Genbank 中检索到一段甜菜 NR 基因的 EST 序列(登录号:BI096296)和 NR 基因组 DNA 的部分序列(登录号:AF173664),依据此序列设计引物,以 Ty7 的总 RNA 为模板,进行 PCR 扩增,得到两个序列 P1 和 P2。利用 P1 和 P2 设计向外扩增的引物,并且利用 RACE 法扩增 NR 基因的 5'端序列和 3'端序列,将已获得的甜菜 NR cDNA 序列,采用 DNASTAR 7.0 进行序列拼接分析,查明中间序列有缺失,然后采用引物在线设计程序 Primer 3 设计引物,设计出缺失片段的引物,反转录合成 cDNA 第一链作为模板,扩增,得到 P3,将已得到的甜菜 NR cDNA 的序列(P1、P2、P3、cDNA 3'端、cDNA 5'端)进行序列拼接分析,得到拼接序列全长。

1.2.2 基因的克隆与测序 运用 Primer 3 设计编码区两端的引物,反转录合成 cDNA 第一链作为模板,扩增,扩增产物与 pMD18-T Vector 进行 16 °C 酒精浴过夜连接反应,转化 JM109 感受态细胞,蓝白斑筛选后,挑取阳性重组克隆,提取质粒 DNA,进行单、双酶切鉴定,阳性克隆送金思特科技(南京)有限公司进行测序。

1.2.3 生物信息学分析 首先用 ORF Finder 对基因序列进行 ORF(开放阅读框)分析,再利用 Top-Pred(徐建华和朱家勇,2005)、ANTHEPORT(殷志祥,2004)等软件分析 NR 基因编码蛋白的疏水曲线与跨膜曲线,Clusta W 系统进化树分析(王安娜等,2010),GOR4 法预测二级结构(Gamier *et al.*, 1996;张桂荣,2010);同时,应用 NCBI CD Search、Signal P 对甜菜 NR 基因编码蛋白的功能进行预测(Nakai & Horton,1999;贺光,2002;丁忠涛等,

2011;徐飞等,2011)。

1.2.4 植物外源基因表达载体的构建 将回收的基因片段用公用 Buffer 37 °C 双酶切 (*Bgl* II、*Spe* I), 载体为 pCambia1302 用相同酶切体系进行双酶切。双酶切后琼脂糖电泳,再回收片段和载体,用 TaKaRa 的 T4 DNA 连接酶连接过夜。将连接产物加到 *E. coli* JM109 感受态细胞中,在卡那抗性的培养板筛选阳性转化子。阳性克隆的菌落摇菌后制备质粒送金思特科技(南京)有限公司进行测序验证,测序正确后保存质粒。

1.2.5 农杆菌介导的浸花序法转化拟南芥 将构建好的带 hygromycin 抗性基因的载体,加到农杆菌 GV3101 感受态细胞,培养 2 d。挑出单克隆 PCR 鉴定为阳性转化子后,继续培养并收集菌体。将浸润培养基对 Col-0、*Atnoal/rif1* 和 *nialnia2* 突变体拟南芥进行浸花处理,暗培养 24 h 后恢复正常光照。人工气候室中正常培养开花结实,当拟南芥种子成熟后收取种子并在 37 °C 晾干,待用。将晾干后的种子灭菌后播于含潮霉素的 MSO 的平板上,进行抗性筛选,得到阳性苗后移栽于拟南芥土中生长。等苗长大即培养约 2 周后,取叶片提基因组,用 PCR 进行鉴定阳性苗。

1.2.6 重力刺激下拟南芥突变体的表型鉴定 将各拟南芥种子灭菌,4 °C 放置 48 h 后移至培养间 25 °C 光照 12 h,垂直放置培养一周,再将苗移至新培养基上,进行重力刺激,即将苗水平放置 3、6、9、12、24 h,观察根弯曲情况,拍照统计结果。

2 结果与分析

2.1 P1、P2 的克隆

通过 Ty7 叶片中提取的总 RNA,测定 OD₂₆₀ 与 OD₂₈₀ 的比值大于 2.0,说明 RNA 纯度较纯,且检测提取的 RNA 无降解,亦无蛋白质、苯酚等污染;经上、下游引物对扩增,分别得到 550、620 bp 的甜菜 NR cDNA 的 P1、P2 片段,结果如图 1。

2.2 RACE 法克隆 5' 和 3' 端 cDNA

参照 5'-RACE、3'-RACE Kit,扩增得到 cDNA 5' 端为 760 bp 和 cDNA 3' 端为 1 200 bp,结果如图 2。

2.3 P3 的克隆

将之前获得的甜菜 NR cDNA 的序列,利用 DNASTAR 7.0 进行序列拼接分析,显示出中间序

列有缺失。然后利用引物在线设计程序 Primer 3 设计引物,设计出缺失片段的引物,经上、下游引物对扩增,得到 520 bp 的甜菜 NR cDNA 的 P3 片段,结果如图 3。

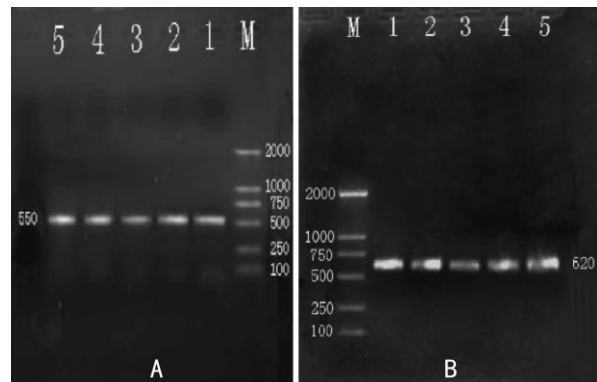


图 1 P1、P2 的 PCR 电泳图

Fig. 1 Electrophoresis result of P1, P2 by PCR

A. P1 的 PCR 电泳图(M:DL 2000 Marker; 1-5:P1 的 PCR 结果);
B. P2 的 PCR 电泳图(M:DL 2000 Marker; 1-5:P2 的 PCR 结果)。

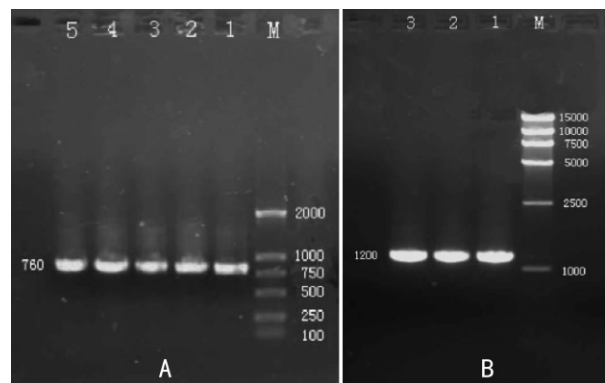


图 2 cDNA 5' 端、3' 端克隆的 PCR 电泳图

Fig. 2 Electrophoresis result of cDNA 5', 3' end cloning by PCR

A. cDNA 5' 端克隆的 PCR 电泳图(M:DL 2000 Marker; 1-5: cDNA 5' 端的 PCR 结果); B. cDNA 3' 端克隆的 PCR 电泳图(M:DL 15000 Marker; 1-3: cDNA 3' 端的 PCR 结果)。

2.4 cDNA 全长的克隆与酶切鉴定

经上、下游引物对扩增,得到甜菜 NR 的全长 cDNA 为 2 900 bp 左右片段,与预期的 NR 基因全长大小相符(图 4: A);将所得的 PCR 产物克隆至 pMD18-T 载体,转化大肠杆菌 JM109,挑取阳性克隆,提取质粒,酶切鉴定,结果如图 4: B。

2.5 生物信息学分析

测序分析表明, NR 基因全长 2 760 bp,采用 ORF Finder 分析,得到一条长 2 718 bp 的完整

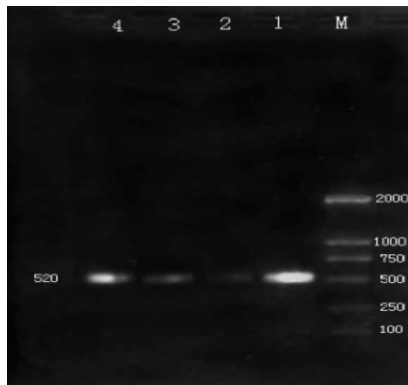


图 3 P3 的 PCR 电泳图

Fig. 3 Electrophoresis result of P3 by PCR

M: DL 2000 Marker; 1-4: P3 的 PCR 结果。

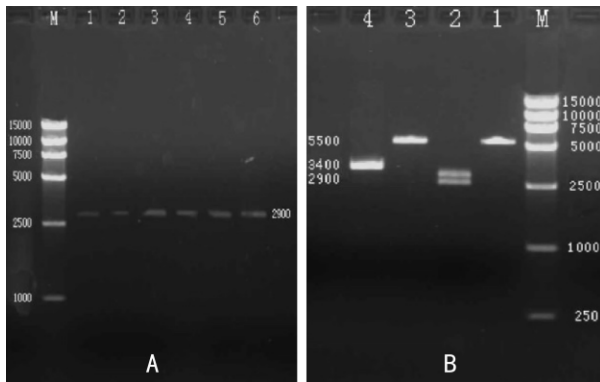


图 4 cDNA 全长及酶切鉴定 PCR 电泳图

Fig. 4 Electrophoresis result of complete cDNA by PCR and by enzyme digestion

A: cDNA 全长的 PCR 电泳图(M: DL 15000 Marker; 1-6: cDNA 全长的 PCR 结果); B: cDNA 全长的酶切 PCR 电泳图(M: DL 15000 Marker; 1: *Pst* I 单酶切; 2: 双酶切; 3: *Eco*R I 单酶切; 4: 质粒)。

ORF(Open Reading Frame)开放读码框(图 5:A, 箭头所示), 起始密码子位于 148 bp, 终止密码子位于 2 865 bp, 推测共编码 905 个氨基酸; 利用 TopPred 软件分析甜菜 NR 疏水曲线, 纵坐标表示蛋白质中残基的亲水/疏水特性, 横坐标表示蛋白质中氨基酸残基的序号, 其中正值表示疏水, 负值表示亲水, 而疏水性较高的肽段位于蛋白质的内部, 否则, 亲水性较高的肽段位于蛋白质分子的表面。从图 5:B 结果显示, NR 为一种亲水性较强的可溶性蛋白质, 且推测此蛋白质含有跨膜肽段。利用 ANTHEPORT 软件分析的跨膜曲线更能直观地说明这一点, 由图 5:C 中, 结果显示 C 端确实存在一个跨膜区; 应用

Clustal W 进行系统进化树分析, 分析结果如图 5:D 所示。甜菜 NR 与菠菜(*Spinacia oleracea*) NR 的亲缘关系最近, 同源性达到 86%, 来自于同一个分枝; 其次, 甜菜 NR 与烟草(*Nicotiana benthamiana*)、马铃薯(*Solanum tuberosum*)、蓖麻(*Ricinus communis*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、玉米(*Zea mays*)、大麦(*Hordeum vulgare subsp. vulgare*)、桃(*Prunus persica*)、大豆(*Glycine max*)、阔叶槲(*Tilia platyphyllos*)、毛果杨(*Populus trichocarpa*) 等的 NR 蛋白有很显著的同源性; 采用 GOR4 算法预测, NR 的二级结构如图 5:E 所示, 结果表明, 甜菜 NR 的 α 螺旋(h): 198, 21.88%, β 折叠(e): 213, 23.54%, 随机卷曲(c): 494, 54.59%。

利用 NCBI 的保守域(CD)预测 NR 的结构域, 图 5:F 表明甜菜 NR 基因编码蛋白的保守域结构包括钼辅蛋白结合域, 细胞色素 b5 结合域, FAD 结合域及 NADH 结合域; 用 Signal P 对 NR 进行信号肽预测, 图 5:G 可以直观地看出, 甜菜 NR 没有信号肽; 利用 TMpred 网络服务器对目标蛋白质进行跨膜区预测, 提交 NR 蛋白序列, 图 5:H 可以直观地看出, NR 蛋白存在两个由内向外的跨膜区, 一个由外向内的跨膜区, 分别位于 201~279 处、776~794 处和 778~796 之间。

2.6 植物外源基因表达载体的构建

通过 PCR 扩增得到的条带如图 6:A 所示, Sb-NR 全长为 2 760 bp, 琼脂糖电泳后胶回收条带, 再琼脂糖电泳确定其大小, 连接到 pCambia1302 上, 转化鉴定确定连接到载体上后送金思特科技(南京)有限公司测序, 测序结果正确。构建好的载体用 *Bgl* II 和 *Spe* I 进行双酶切后的条带大小同从 cDNA 模板上扩增出的大小一致, 如图 6:B 所示。

2.7 转基因拟南芥植株的鉴定

将 pCambia1302-SbNR 载体转化到农杆菌 GV3101 中, 再利用农杆菌浸花序法将目的基因转到野生型和突变体拟南芥植株中, 收获 T₀ 代种子。对 T₀ 种子用含潮霉素抗性在 MSO 平板上筛选得到的阳性苗, 培养 2 周后进行取样提取基因组, 用 PCR 鉴定阳性苗。结果表明能在含潮霉素 MSO 的培养基上正常生根的苗均为含转化子的阳性苗。如图 7 所示, 用 HPT II 基因的短片段引物进行 PCR 扩增得到正确的大小的基因片段。

用 Tizol 法提取阳性拟南芥苗的 RNA, 反转录后做 PCR, 鉴定转化的甜菜硝酸还原酶的 SbNR 后

的基因表达情况,如图 8 所示,转化的拟南芥都能表

2.8 拟南芥突变体 *Atnoa1/rif1*、*nia1nia2* 对重力刺激应答反应情况

野生型拟南芥苗在随着时间的增加对弯曲的感

3 讨论

3.1 实验材料

大多栽培糖甜菜是高度杂合的多倍体,基因组比较复杂。而本文选用的是目前栽培面积比较大的二倍体纯系甜研 7 号(Ty7)为试材,这样不仅可以适合甜菜基因克隆的需要,同时也具有一定的代表性。

3.2 RACE 法克隆目的基因

RACE(Rapid Amplification of cDNA Ends)技术是借助 PCR(Polymerase Chain Reaction)技术发展起来的,也是一种高效分离目的基因的方法。RACE 法可以从低含量转录产物中快速扩增出 cDNA 3'和 5'端。近年来,RACE 法的广泛应用显示出,它是一种迅速、高效地克隆 cDNA 全长,尤其是从微量甚至痕量 RNA 克隆 cDNA 全长的方法。对 RACE 法的创新,伴随着诸如 PCR 扩增效率、忠实性的提高以及 PCR 产物克隆技术的发展,RACE 法在目的基因克隆、RNA 剪接、基因家族和基因表达变化的研究中起着越来越重要的作用。如果想成功地扩增出目的基因,mRNA 逆转录合成第一条 cDNA 链是 RACE 法中的关键环节,对于得到 cDNA 全长 5'端来说更为重要。由于 mRNA 逆转录时常会产生截短的 cDNA 片段,而截短的 cDNA 在后续的反应中会优先扩增,产生大量非特异性产物,本文选用 SuperScript III 反转录酶获得全长 cDNA,该酶能降低 RNase H 活性,在 50 °C 时具有全部活性,可增加使用基因特异引物的特异性。

在 PCR 扩增反应中,反应的特异性必须注意。为了提高特异性,主要应用热启动 PCR(hot start PCR)技术,即在第一个循环中将一种 PCR 关键成分(如 DNA 聚合酶、 Mg^{2+} 或引物等)手工加入到已经在高于 T_m 值的温度预热的反应体系中,使得引物与模板的配对特异性更强,本文利用 RACE 法成功地得到 NR 的全长 cDNA,再次体现了 RACE 法在克隆新基因上应用的潜力和具有的优越性。

达外源基因。

应比突变体的较快,向下弯曲程度大,在 12 h 时最为明显,如图 9 所示,随后差异逐渐减小。

3.3 生物信息学分析

预测蛋白质结构的目的在于利用已知的蛋白质氨基酸序列即一级序列来构建出蛋白质的三维结构模型,而二级结构的预测准确率一般在 55%~65%,然而,当前认为二级结构的预测准确率如果达到 85%,就可以基本准确地预测一个蛋白质分子的三维结构。本文利用 GOR4 算法对甜菜 NR 的二级结构进行了分析,预测结果表明,NR 为混合型蛋白(α 螺旋占 21.88%, β 折叠占 23.54%),这为三维空间结构的预测打下了坚实的理论基础。当前,如果某种蛋白质的一级结构确定以后,就可以方便地利用网络服务器对相关数据库进行检索分析,与已知的蛋白质的氨基酸序列进行比较,通过这一比较,可以建立一些蛋白的超家族。这样的比较经常可以获得一些意外的效果,可以发现一些蛋白质含有一些新的结构域或者模体,并由此揭示一些蛋白质可能具有的新功能。

3.4 SbNR 在拟南芥中的表达

将外源基因转入拟南芥中进行表达,从而来研究该外源基因的某些功能是常见的实验方法。利用拟南芥 NO 相关的突变体 *Atnoa1/rif1* 和 *nia1nia2* 来研究植物 NO,通过对拟南芥野生型和突变体的比较来观察表型是对基因功能研究的常用手段。

突变体拟南芥苗对向重性反应的减慢表明:拟南芥的 *nia1* 和 *nia2* 基因可能间接或者直接的参与植物对重力的应答过程,而突变体 *Atnoa1/rif1* 则表明拟南芥中内源 NO 的含量与植物的向重性有关。这同硝酸还原酶基因在甜菜中向重性刺激下其 mRNA 表达水平的不对称性是具有相似性的,这也说明了在植物体内 NO 对重力刺激的应答模式可能是一致的。

本文采用 RACE 法成功克隆到甜菜 NR 基因并对 NR 生物信息学进行了分析,并利用拟南芥的体外表达,对其基因功能做了初步研究,但对其特性分析还有待于进一步研究,以便为后续通过基因工程方法有效合理施用氮肥,提高甜菜品质与产量提供依据。

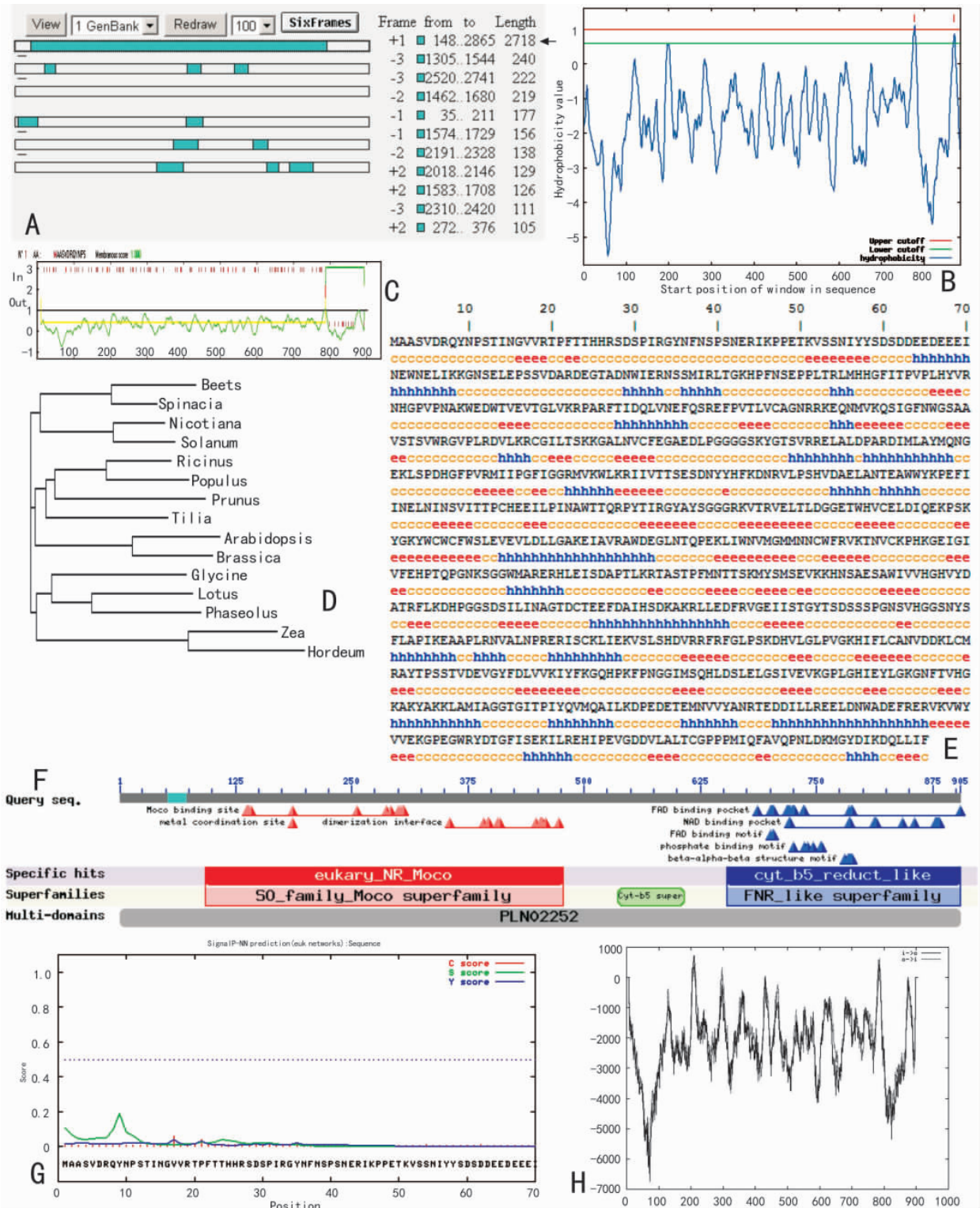


图 5 生物信息学分析

Fig. 5 The analysis of bioinformatics

A. ORF 分析; B. 用 TopPred 分析 NR 的疏水曲线; C. 跨膜曲线分析; D. 系统进化树分析; E. 采用 GOR4 算法预测的甜菜 NR 蛋白二级结构; F. NR 的保守域; G. NR 的信号肽预测; H. Tmpred 预测 NR 的跨膜区。

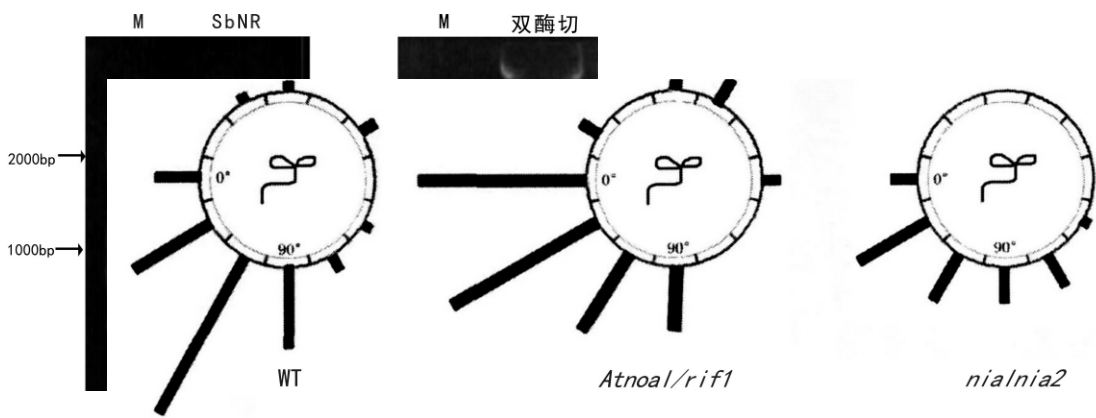


图 6 SbNR 全长片段与双酶切载体处理 12 h, 野生型和突变体根弯曲情况

Fig. 6 The cloning of full length SbNR in WT, the NO deficient mutants *Atnoal/rif1* and the confirmation of pGambia236 displayed compromised root gravity response

SbNR wt: 野生型拟南芥重力刺激 12 h 下根尖的弯曲情况 (N=67); *Atno1/rif1*: 突变体在重力刺激 12 h 下根尖弯曲情况 (N=67); *nialnia2*: 突变体在重力刺激 12 h 下根尖弯曲情况 (N=34)。A. PCR 克隆基因 SbNR 鉴定; B. 载体双酶切鉴定; M: DL 2000 Marker

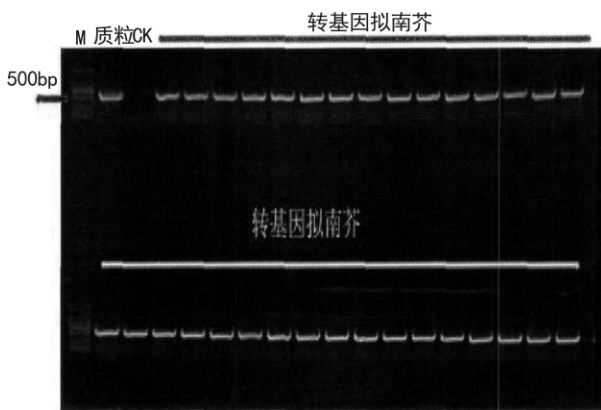


图 7 阳性转化苗基因组中克隆的 HPT II 片段的电泳结果

Fig. 7 The identification of positive seedlings by genomic PCR using primers specific to HPT II

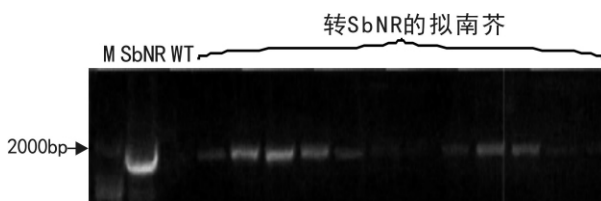


图 8 阳性苗的 RT-PCR 鉴定结果

Fig. 8 Confirmation of transgenic seedling by RT-PCR using primers specific to SbNR

参考文献:

宋松泉,王永瑞,傅家瑞. 1993. 高等植物中硝酸还原酶的研究进展[J]. 作物杂志, (4):32-35

周仁喜. 1986. 论甜菜氮代谢及其与糖代谢的关系——甜菜合

理施用氮肥的依据[J]. 甜菜糖业, (4):12-14

贺光. 2002. 生物信息学在蛋白质研究中的应用[J]. 国外医学. 遗传学分册, 25(3):156-158

Amey RC, Athey-Pollard A, Mills PR, et al. 2007. Investigations into the taxonomy of the mushroom pathogen *Verticillium fungicola* and its relatives based on sequence analysis of nitrate reductase and ITS regions[J]. *Microbiology*, 76(6):757-768

Besson-Bard A, Pugin A, Wendehenne D. 2008. New insights into nitric oxide signaling in plants[J]. *Ann Rev Plant Biol*, 59:21-39

Caboche M, Rouze P. 1990. Nitrate reductase: A target for molecular and cellular studies in higher plants[J]. *Trend Genet*, 6(6):187-192

Chen ZY(陈志英), Ma FM(马凤鸣), 2008. Research progress on nitrate reductase of sugar beet(甜菜硝酸还原酶的研究进展)[J]. *J Northeast Agric Univ(东北农业大学学报)*, 39(7):131-135

Ding ZT(丁忠涛), Zhang R(张锐), Guo SD(郭三堆). 2011. Cloning and bioinformatics analysis of cotton gene *GhDr1* related to resistance to abiotic stresses(棉花抗逆相关基因 *GhDr1* 的克隆及生物信息学分析)[J]. *Biotechnol Bull(生物技术通报)*, (1):100-106

Garnier J, Gibrat JF, Robson B. 1996. GOR secondary structure prediction method version IV [J]. *Methods Enzymol*, 266:540-553

Hyde GE, Crawford NM, Campbell WH. 1991. The sequence of squash NADH: nitrate reductase and its relationship to the sequences of other flavoprotein oxidoreductases A family (下转第 101 页 Continue on page 101)

quality in rice(氮肥运筹对水稻产量及稻米品质的影)[J]. *J Yangzhou Univ*(扬州大学学报), **23**(3):46-50

Ju XT, Kou CL, Christie P, *et al.* 2007. Changes in the soil environment from excessive application of fertilizers and manures to two contrasting intensive cropping systems on the North China Plain[J]. *Environ Poll*, **45**:497-506

Shan YH(单玉华), Wang YL(王余龙), Huang JY(黄建晔), *et al.* 2000. Effect of nitrogen fertilizer applied at middle and late growing stages on ¹⁵N uptake and distribution in rice(中后期追施¹⁵N对水稻氮素积累与分配的影响)[J]. *Jiangsu Agric Res*(江苏农业研究), **21**(4):18-21

Su XJ(粟学俊), Wei PX(韦鹏霄), Lu ZR(吕志仁). 2004. Study on the combining ability of the yield-traits in hybrid rice(杂交水稻产量性状配合力研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), **24**(1):91-96

Xu RL(许仁良), Dai QG(戴其根), Wang XQ(王秀芹), *et al.* 2005. Effect of different N-fertilizer, N-fertilizer management and N-fertilizer planning on N use efficiency in Rice(氮肥施用量、施用时期及运筹对水稻氮素利用率影响研究)[J]. *Jiangsu Agric Res*(江苏农业科学), (2):19-22

Zhang XJ(张学军), Zhao Y(赵营), Chen XQ(陈晓群), *et al.* 2010. Effect of different water and N supply on the yield, N uptake and water/N use efficiency of rice(不同水氮供应对水稻产量、吸氮量及水氮利用效率的影响)[J]. *Chin Agric Sci Bull*(中国农业通报), **26**(4):126-131

Zhang X(张欣), Shi LL(施利利), Liu XY(刘晓宇), *et al.* 2010. Effect of different fertilizer treatments on rice yield, grain quality and protein fraction content(不同施肥处理对水稻产量、食味品质及蛋白质组分的影响)[J]. *Chin Agric Sci Bull*(中国农学通报), **26**(4):104-108

Zhang ML(张满利), Chen Y(陈盈), Hou SG(侯守贵), *et al.* 2010. Effect of nitrogen management on the yield and N use efficiency of rice(氮肥运筹对水稻产量和氮肥利用率的影响)[J]. *Crops*(作物杂志), **6**:46-50

Zeng YJ(曾勇军), Shi QH(石庆华), Pan XH(潘晓华), *et al.* 2008. Effects of nitrogen application amount on characteristics of nitrogen utilization and yield formation in high yielding early hybrid rice(施氮量对高产早稻氮素利用特征及产量形成的影响)[J]. *Acta Agron Sin*(作物学报), **34**(8):1 409-1 416

(上接第 95 页 Continue from page 95)

of flavoprotein pyridine nucleotide cytochrome reductases[J]. *J Biol Chem*, **266**(35):23 542-23 547

Mao WH(毛伟华), Gong YM(龚亚明), Xia XJ(夏晓剑), *et al.* 2007. Cloning of a cDNA fragment of nitrate reductase (NR) gene in cucumber and its expression analysis under nitrogen deficiency stress(黄瓜硝酸还原酶 cDNA 片段的克隆及其在缺氮胁迫下的表达)[J]. *Acta Agric Zhejiang*(浙江农业学报), **19**(3):160-163

Meyer C, Lea US, Provan F, *et al.* 2005. Is nitrate reductase a major player in the plant NO(nitric oxide) game[J]. *Photosynth Res*, **83**:181-189

Modolo LV, Augusto O, Almeida IM, *et al.* 2005. Nitrite as the major source of nitric oxide production by *Arabidopsis thaliana* in response to *Pseudomonas syringae*[J]. *FEBS Lett*, **579**:3 814-3 820

Nakai K, Horton P. 1999. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization[J]. *Trend Biochem Sci*, **24**(1):34-36

Parihar A, Parihar MS, Chen Z, *et al.* 2008. mAtNOS1 induces apoptosis of human mammary adenocarcinoma cells[J]. *Life Sci*, **82**:1077-1082

Qu WZ(曲文章), Cui J(崔杰), Li BS(李滨胜). 1992. The Formation of Sugarbeet Yield and Amounts of Nitrogen Applied(施氮量与甜菜产量的形成)[J]. *Sugar Crops Chin*(中国糖料), (4):29-34

Tian H(田华), Duan MY(段美洋), Wang L(王兰). 2009. Research progress on nitrate reductase functions in plants(植物硝酸还原酶功能的研究进展)[J]. *Chin Agric Sci Bull*(中国农学通报), **25**(10):96-99

Wang AN(王安娜), Wang CC(王婵婵), Wu L(吴蕾), *et al.* 2010. Soybean C4H gene clone and bioinformatics analysis(大豆 C4H 基因克隆及生物信息学分析)[J]. *J Northeast Agric Univ*(东北农业大学学报), (4):12-16

Wang LQ(王利群), Wang Y(王勇), Dong Y(董英), *et al.* 2003. Induced activity of nitrate reductase by nitrate and cloning of nitrate reductase gene(硝酸盐对硝酸还原酶活性的诱导及硝酸还原酶基因的克隆)[J]. *Chin J Biotechnol*(生物工程学报), (5):632-635

Xu F(徐飞), Cheng SR(成述儒), Luo YZ(罗玉柱). 2011. Bioinformatics analysis of sheep DRB1 gene(绵羊 DRB1 基因生物信息学分析)[J]. *Biotechnol Bull*(生物技术通报), (1):114-117

Xu JH(徐建华), Zhu JY(朱家勇). 2005. Bioinformatics and its application on protein structure and function prediction(生物信息学在蛋白质结构与功能预测中的应用)[J]. *Foreign Med Sci*(医学分子生物学杂志), **2**(3):227-232

Yin ZX(殷志祥). 2004. Research progress of protein structure prediction(蛋白质结构预测方法的研究进展)[J]. *Comp Engin Appl*(计算机工程与应用), (20):54-57

Yu HB(于海彬), Sun LY(孙立英), Cai B(蔡葆). 1988. Studies on the characters of sugar and nitrogen metabolism in sugar beet (甜菜糖氮代谢特点的研究)[J]. *Sugar Crops Chin*(中国糖料), (4):11-17

Zhang GR(张桂荣). 2010. In silico cloning of cryptochrome gene cry2 from *Zea mays* and its bioinformatics analysis(玉米隐花色素基因 cry2 的电子克隆及生物信息学分析)[J]. *J Anhui Agric Sci*(安徽农业科学), **38**(19):9 975-9 978

Zhou J, Kleinhofs A. 1996. Molecular evolution of nitrate reductase genes[J]. *J Mol Evol*, **42**(4):432-442