

分子植物育种
Molecular Plant Breeding
ISSN 1672-416X, CN 46-1068/S

《分子植物育种》网络首发论文

题目：转基因烟草中半胱氨酸跨膜基因 CYS 生物信息学分析
作者：罗香怡，高洁铭，刘明慧，曹东，宗渊，刘宝龙，魏乐
网络首发日期：2020-10-26
引用格式：罗香怡，高洁铭，刘明慧，曹东，宗渊，刘宝龙，魏乐. 转基因烟草中半胱氨酸跨膜基因 CYS 生物信息学分析. 分子植物育种.
<https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20201026.1038.004.html>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

研究报告

Research Report

转基因烟草中半胱氨酸跨膜基因CYS生物信息学分析

罗香怡¹ 高洁铭² 刘明慧¹ 曹东³ 宗渊^{2,3} 刘宝龙^{3*} 魏乐^{1*}

1青海师范大学, 西宁, 810008; 2青海大学, 西宁, 810016; 3中科院西北高原生物研究所, 青海省作物分子育种重点实验室, 西宁, 810001

*共同通信作者, beyond_3862740@163.com; blliu@nwipb.cas.cn

摘要 在烟草中过量表达MYB转录因子*LrAN2*, 能够激活上调花青素生物合成代谢通路, 但富含半胱氨酸跨膜结构域蛋白A(CYS)的表达量明显降低。作为植物中一种重要的生物氨基酸, CYS的生物学研究鲜有报道。本研究克隆烟草的CYS基因, 其全长为282 bp, 编码氨基酸数94个。预测编码的蛋白分子量和等电点分别为 24019.84 Da和5.23, 并且序列中没有保守区。实验结果显示该蛋白具有亲水性, 主要由 α -螺旋(19.35%)和不规则盘绕(65.59%)构成, CYS蛋白质不通过跨膜区, 在膜外进行作用。系统发育树显示, 烟草CYS基因与辣椒CYS基因亲缘关系最近, 其次是番茄的HTC基因和WIH2基因。本研究结果克隆并分析CYS基因编码区序列, 为CYS基因的功能研究提供参考依据。

关键词 烟草, CYS, 基因克隆, 生物信息学分析

Bioinformatics Analysis of Cysteine Transmembrane Gene CYS in Transgenic Tobacco

Luo Xiangyi¹ Gao Jieming² Liu Minghui¹ Cao Dong³ Zong Yuan^{2,3} Liu Baolong^{3*} Wei Le^{1*}

1 Qinghai Normal University, Xining, 810008; 2 Qinghai University, Xining, 810016; 3 Key Laboratory of Crop Molecular Breeding of Qinghai Province, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining, 810001

* Co-corresponding authors, beyond_3862740@163.com; blliu@nwipb.cas.cn

Abstract Overexpression of MYB transcription factor *LrAN2* in tobacco can activate up-regulation of anthocyanin biosynthetic pathways, but the expression of cysteine-rich transmembrane domain protein A (CYS) is significantly reduced. As an important biological amino acid in plants, the biological research of CYS is rarely reported. In this study, the cloned tobacco CYS gene is 282bp long and encoding 94 amino acids. The predicted molecular weight and isoelectric point of the encoded protein are 24019.84 Da and 5.23, respectively, and there are

no conserved regions in the sequence. The experimental results show that the protein is hydrophilic, mainly composed of α -helix (19.35%) and irregular coil (65.59%), CYS protein does not pass through the transmembrane region and acts outside the membrane. Phylogenetic tree shows that the CYS gene in tobacco was closely related to the CYS gene in pepper, followed by HTC gene and WIH2 gene in tomato. The results of this study cloned and analyzed the sequence of the coding region of CYS gene to provide a reference for the functional study of CYS gene.

Keywords Tobacco, CYS, Gene cloning, Bioinformatics analysis

烟草是一年生茄科烟草属的植物，作为重要的经济作物之一，在世界各地广为种植。烟草不但能制成卷烟等经济商品，其药用价值也是极高的，例如治疗慢性疾病及心血管疾病，止咳，杀菌等(王琴仙, 2016, 河南农业, (32): 57)。此外，烟草蛋白中氨基酸数量大、种类多，加工以后可以生产出高附加值的肽类和氨基酸产品，这些蛋白在饮食、生物化学以及医药等方面发挥重要的作用，具有广阔的应用前景(刘旭强等, 2014)。本研究前期从黑枸杞中分离得到一类诱导植物花青素的合成的含有 MYB 结构域的 MYB 转录因子 *LrAN2*，该基因与其他茄科作物中调控花青素合成代谢相关的 MYB 转录因子聚为一类(Zong et al., 2019b)。随着果实的发育，*LrAN2* 的表达量也随之升高，在烟草中过量表达 *LrAN2* 后烟草所有组织部位都不同程度显现出紫色表型。将紫色烟草和绿色野生型进行转录组分析，结果显示紫色烟草所有参与花青素生物合成相关结构基因都被激活，但也有部分基因在紫色烟草中表达量下调，其中富含半胱氨酸跨膜结构域蛋白 A(CYS)在紫色烟草中表达量下调最显著(Zong et al., 2019a)。

半胱氨酸是生物体养分所需的条件必要氨基酸，它属于 α -氨基酸，且是生糖氨基酸(王煜等, 2018)。谷胱甘肽(GSH)在人体内起到抗氧化的作用，它的大部分成分是半胱氨酸。在植物大多数的细胞结构中都含有半胱氨酸。在植物中硫是比较重要的营养元素，植物将氧化态的硫吸收还原后，首先就是要合成半胱氨酸使其进入各种代谢中(王小芳等, 2011)。半胱氨酸合成酶复合物可以较好的调节半胱氨酸合成，它可以通过 O-乙酰丝氨酸硫醇裂合酶(OASS)与丝氨酸乙酰转移酶(SAT)生成。半胱氨酸蛋白酶一种重要的蛋白酶，在各种植物生理反应中都发挥重要作用，包括种子发芽、花和叶发育、果实成熟以及豆科植物根瘤生长在根内，并参与植物对各种胁迫的反应(包括干旱，病原体感染)等。研究发现在逆境(如盐碱，低温和干旱)胁迫下，半胱氨酸蛋白酶的 mRNA 数量会上升，当某些植物细胞发生程序性死亡时，半胱氨酸蛋白酶 mRNA 的数量同样会升高。因此，植物的发育会因为半胱氨酸蛋白酶活性的降低发生不同程度的变化(Zhao et al., 2012)。

植物叶片在衰老过程中,半胱氨酸蛋白酶通过对叶片蛋白的降解生成大量细胞氮以供给循环利用(Xiao et al., 2014)。半胱氨酸蛋白酶以半胱氨酸残基为活动中心,并且它参与了高等植物的多种蛋白质水解功能(Roberts et al.,2012)。近年来,植物衰老有关的半胱氨酸蛋白酶研究集中在 mRNA 水平以及翻译后蛋白酶活性方面(Macieli et al.,2011)。目前研究人员在辣椒中克隆一个新的衰老相关基因 *CaCp*,它属于木瓜蛋白酶超家族且与其他已知半胱氨酸蛋白酶同源性高度相似,在辣椒对盐胁迫和渗透胁迫的防御反应中起到负调控作用,从而延缓了叶片衰老。同时,研究者从番茄叶片衰老文库中分离的两个上调的 cDNA, SENU2 和 SENU3,编码半胱氨酸蛋白酶, SENU2、SENU3 mRNA 与叶片衰老密切相关(Zang et al., 2010)。

在烟草中过量表达 MYB 转录因子的同时抑制了 CYS 的表达,本研究计划分离 CYS 基因组和编码区序列,初步了解 CYS 基因相关生物信息学基础,为后续烟草中 CYS 功能研究做好前期基础工作。

1结果与分析

1.1目的基因的克隆

实验材料分别为转基因紫色烟草(图 1A)和阴性对照烟草 Samsun(图 1B)。提取了烟草总 RNA, RNA 电泳图如下(图 2A), 18S 和 28S 条带清晰明显, RNA 样本可进行下一步实验。将上述提取 RNA 进行反转录后,利用特异性引物 CYS-F: ATGAGTTACTACAATCAAC 和 CYS-R: TCAGAAGCATGCATCTAGGA 进行扩增,得到目的条带 282bp 大小序列,扩增结果(图 2B)显示目的条带特异。

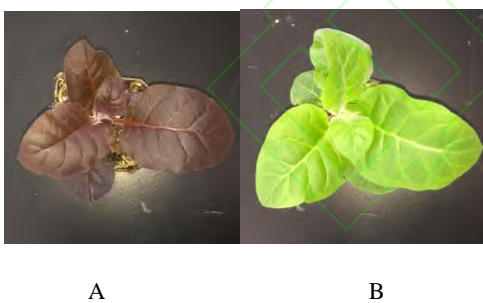
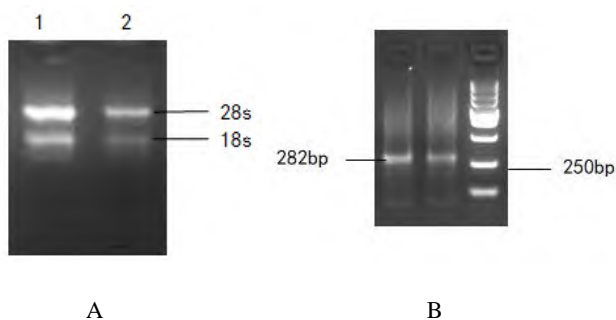


图1转基因紫色烟草(A)和阴性对照烟草 (B)

Figure 1 Transgenic purple tobacco(A) negative control tobacco(B)



A

B

图2烟草RNA检测(A)和烟草cDNA的扩增(B)

注: 1: 烟草RNA重复1; 2: 烟草RNA重复2

Figure 2 RNA detection map of tobacco amplification (A) amplification of tobacco cDNA (B)

Note: 1: Tobacco RNA repeat 1; 2: Tobacco RNA repeat 2

扩增片段回收后进行 TA 克隆, 菌落 PCR 检测结果扩增出条带与目的条带大小相符, 均在 282 bp 左右 (图 3)。

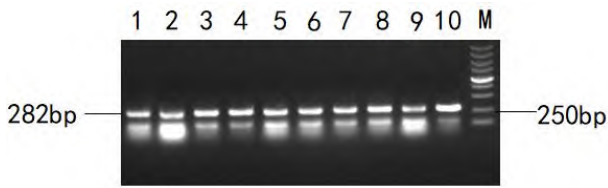


图3菌落PCR检测

注: M: 5000 bpDNA Marker; 1~10: 克隆菌

Figure 3 PCR detection of colony of clonal bacteria

Note: M: 5000 bpDNA Marker; 1~10: Clonal bacteria;

1.2 CYS基因的序列分析

ExPaSy-Protparam软件分析CYS基因的全长为282 bp (图4)。预测蛋白分子量24019.84 Da, 等电点5.23, 不稳定指数(Instability index)为73.95, 表明该蛋白不稳定。脂肪指数(Aliphatic index)常常用作蛋白热稳定增加的阳性因素, 是蛋白质中脂肪侧链如丙氨酸, 亮氨酸等所占的比重, 该蛋白脂肪指数为24.82。

ProtParam

User-provided sequence:

```

10      20      30      40      50      60
ATGAGTTACT ACAAATCAACA ACAACOCOCCT GTTGGTGTGC CTCOCOCGCA AGGATATCCA

70      80      90      100     110     120
COGGAAGGTT ACOCCTAAGGA CGCATACCCA OCACOGGGGT AOCACAAACA GGGTTACCCA

130     140     150     160     170     180
CCACAGGGGT ACOCCTAACA AGGTTACOCCT OCTCAAGGGT AOCCTOCCA GTATGGTGCT

190     200     210     220     230     240
CCAOCOCCTC AACAAACAACA GCAACAATCT GGTAGCACTG GCTTCATGGA AGGATGTTTG

250     260     270     280
GCTGCACTGT GCTGTTGCTG TCTOCTAGAT GCATGCTTCT GA

```

图4 CYS基因全长

Figure 4 Full length of CYS gene

1.3 CYS蛋白能域及亲水性的分析

使用ProtScale 软件进行亲疏水性分析, 平均亲水性范围在-2~2之间, 该蛋白的亲水性系数为-0.490, 表明其具有一定的亲水性特性(图5)。

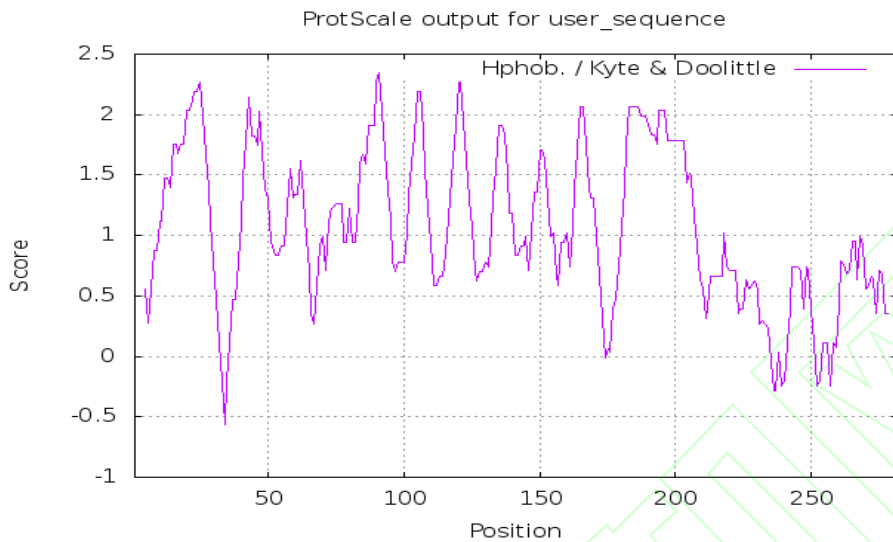


图5 CYS 亲, 疏水性分析

Figure 5 CYS affinity, hydrophobic analysis

1.4 CYS二级结构及其蛋白质跨膜分析

将CYS基因二级结构导入SOPMA软件进行分析, 发现其主要结构形式为 α -螺旋(19.35%)和不规则盘绕(65.59%), 另外还具有延伸链(10.75%)和 β -转角(4.3%) (图6)。

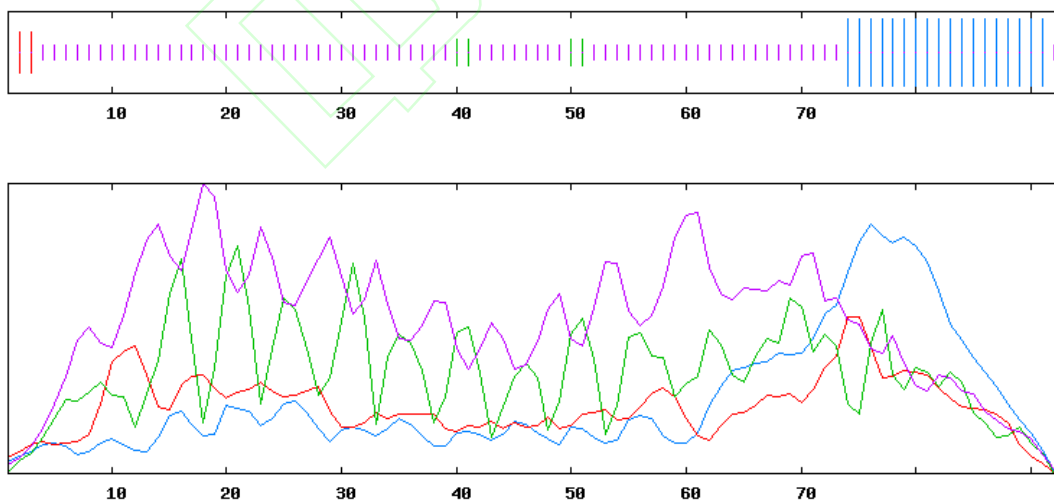


图 6 CYS的二级结构预测分析

注: 蓝色: α -螺旋; 紫色: 无规则卷曲; 红色: 延伸链; 绿色: β -转角

Figure 6 Prediction and analysis of secondary structure of CYS

Note: Blue: Alpha helix; Purple: Random coil; Red: Extended strand; Green: Beta turn

用TMHMM-2.0 软件分析烟草CYS基因的跨膜区，结果显示该蛋白质的跨膜螺旋数量(Number of predicted TMHs)为0，推测该蛋白质不具有跨膜区，在膜外进行作用(图7)。

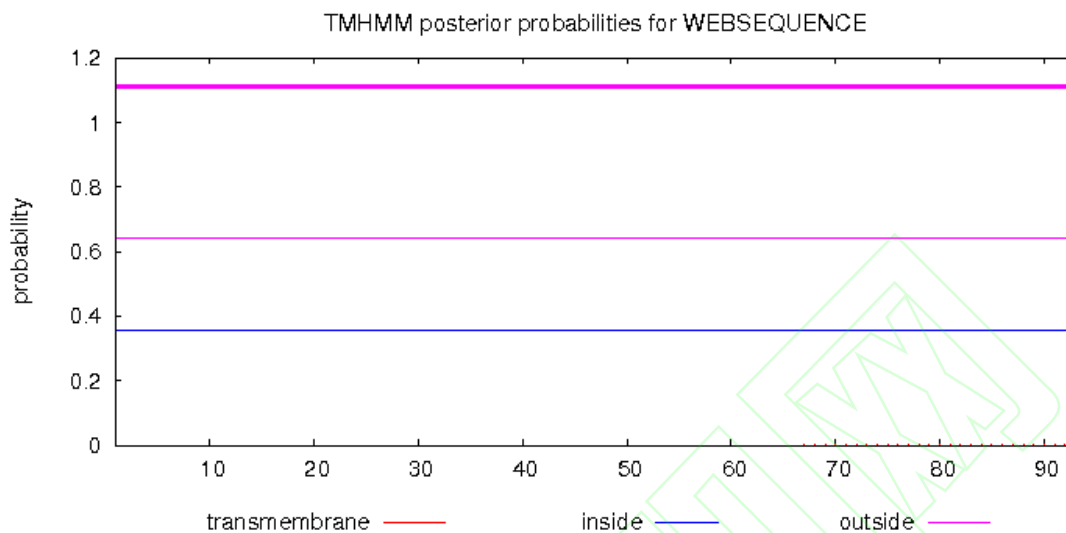


图7 CYS蛋白质跨膜分析

注: 红线: 跨膜区; 蓝线: 膜内; 粉线: 膜外

Figure 7 Transmembrane analysis of CYS protein

Note: Red line: Transmembrane region; Blue line: Inside the membran; Pink line: Outside the membran

用SWISS-MODEL数据库对CYS基因编码蛋白进行同源建模和预测，构建得到该蛋白的三维空间模型(图8)，同时在数据库中对获得与其相似性较高的蛋白：6seh.1.B蛋白，该蛋白属于结构特异性核酸内切酶亚基SLX4，比对覆盖率为0.20，序列一致性为21.05，相似性为0.32。



图8 CYS基因同源建模的3D蛋白模型

Figure 8 CYS gene homology modeling 3D protein model

1.5 CYS亲缘性分析和多序列比对

在MEGA4软件中将CYS基因对比其他植物的氨基酸序列构建出系统进化树(图9)，结果表明，烟草中CYS基因与辣椒中CYS基因亲缘关系相似度最高，其次是番茄基因中的HTC和WIH2。

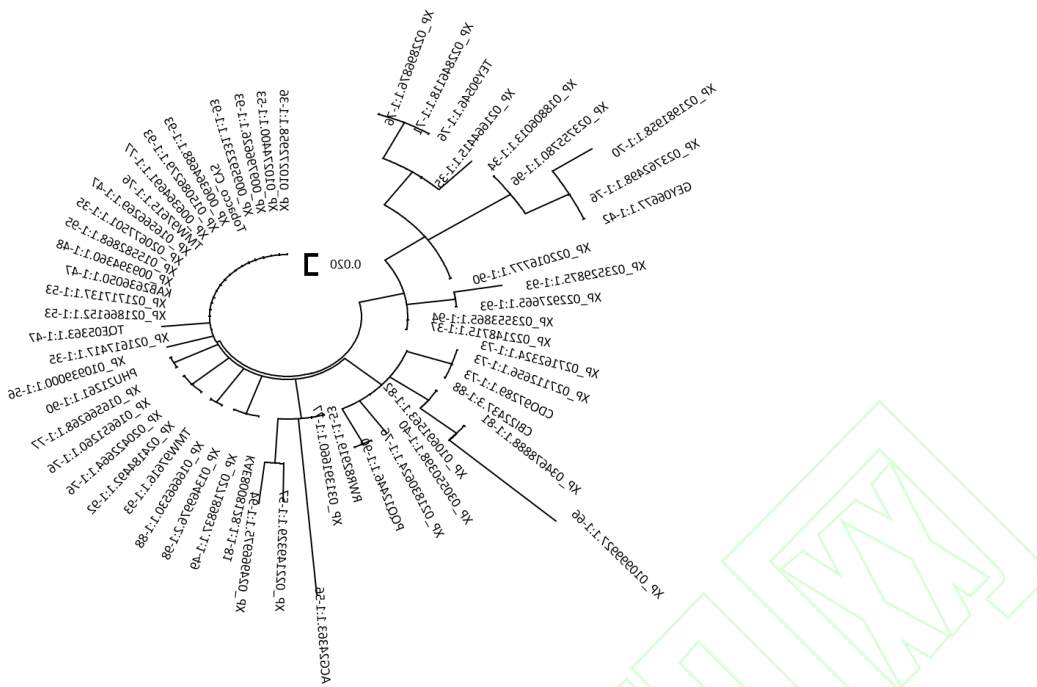


图9 CYS蛋白系统进化树

Figure 9 CYS protein phylogenetic tree

2讨论

本研究从烟草中克隆获得 CYS 基因并对其进行序列分析，发现 CYS 蛋白具有亲水性，CYS 蛋白质不通过跨膜区，而是在膜外进行作用。烟草 CYS 基因在植物中与辣椒和番茄的亲属关系最为相近。

当前对烟草中半胱氨酸的生物分析较少，大多数集中在烟草半胱氨酸蛋白酶的基因和蛋白序列分析以及硒代半胱氨酸甲基转移酶基因生物信息学分析。殷雪艳等(2018)对烟草半胱氨酸蛋白酶基因结构分析显示 NtCP 中的成员在外显子和内含子之间存在着差别，NtCP 具有核心保守基序区 (Motif-1—Motif-2—Motif-4)，Motif-1 和 Motif-2 都含有谷氨酰胺和半胱氨酸，同时 NtCP 均含有信号肽(殷雪艳等, 2018)。且 NtCP 为稳定蛋白，为其参与植物生理反应提供了重要的保障(马世明等, 2018)。烟草半胱氨酸蛋白酶具有跨膜结构，而且处于蛋白质序列的 N 端，说明 NtCP 是跨膜性蛋白，这有利于膜外 N 端接受信号分子，从而作用于蛋白质序列的 C 端发挥作用(Slee et al., 1999)。对硒代半胱氨酸甲基转移酶(CsSMT)基因生物信息学分析发现 CsSMT 编码产物为稳定的亲水性蛋白，没有跨膜结构，也没有信号肽，定位于细胞质基质，CsSMT 基因 mRNA 与拟南芥同型半胱氨酸 s-甲基转移酶基因聚为一组(刘声传等, 2013)。以上对半胱氨酸蛋白酶及甲基转移酶的生物信息学分析为本研究提供了参考，同时也对半胱氨酸生物信息学方面有了更充分的补

充。

植物中半胱氨酸的研究主要是对辣椒、番茄、小麦等植物，例如有关半胱氨酸对植物衰老，耐盐性，渗透胁迫抵御等研究。在辣椒中发现富含半胱氨酸/组氨酸的富含 DC1 域蛋白基因 *CaDC1* 在微生物感染过程中对植物防御起着积极的调节作用。栽培番茄(*Solanum lycopersicum* Zinc Finger2[*SIZF2*])是一种半胱氨酸-2/组氨酸-2 型锌指转录因子，它具有 ERF 相关的两亲性抑制结构域，在植物发育过程中广泛表达，能够延缓衰老和提高番茄的耐盐性。小麦花叶病毒编码半胱氨酸富集蛋白 19K 的结构和功能，发现在 19K-crp 氮端的 Cys8、Cys11、Cys39、Cys49 的突变会很大程度的降低 19K-cys 的稳定性。这些研究都是在植物生长过程中半胱氨酸对于植物发育所起的作用，为更好地培育植物奠定了基础，也为本研究的开展提供了依据。

本研究通过对 CYS 生物信息学分析了解，推测出 CYS 表达量的下调很有可能与植物表型的变化相关。跨膜蛋白位于细胞与外界的交界部位，介导细胞与外界的信号传递，并执行许多十分重要的细胞生物学功能(宋江华和张立新, 2009)，在植物中跨膜蛋白的生物调节与其他生物合成代谢通路密切相关。

3材料与方法

3.1实验材料

本实验研究所需要的烟草材料来源于中国科学院西北高原生物研究所。实验所需材料紫色烟草转基因 Samsun 和绿色烟草 Samsun 两者均种植于青海省麦类分子育种重点实验室植物培养间，并进行隔离保存与种植。种植环境为 25^oC 光照 8 h/天。

3.2基因组RNA及cDNA准备

烟草 RNA 提取。以下离心操作均在 4^oC 环境下和 12 000 r/min 速度下进行。步骤如下：(1)取中等大小的一块烟草叶片，加少量固体的亚硫酸钠，通过液氮冷冻后研磨成粉末，放到离心管中。(2)加入 500 μ L TRIzol 提取液，混匀。(3)离心 5 min 后将上层液体分离向其中加入 200 μ L 的三氯甲烷，振荡。(4)离心 15 min 后取最上层液体并滴入 0.5 mL 异丙醇溶液，混匀。(5)离心 10 min 后将上层液体倒掉并滴入 1 mL 的乙醇清洗沉淀物。(6)离心 5 min 以后将上层液体倒掉待沉淀物干燥后加入 40 μ L 的 DEPC 水溶解(余乃通等, 2017)。

烟草 RNA 反转录。具体操作：取 2 μ L 的烟草 RNA 依次加入 1 μ L 的 Oligo(dT)₁₈，10 μ L 的 2 \times TS Reaction Mix，1 μ L 的 Trans Script RT，取 RNase free water 补至 20 μ L，42^oC 孵育 30 min，85^oC 加热 5 min，然后冰浴 5 min，短暂离心，得到烟草 cDNA(刘小丽等, 2016)。

3.3 CYS基因的分离与克隆

将获得的 cDNA 利用高保真 DNA 聚合酶在 GeneAmp PCR System 9700 PCR 仪上扩增该基因组的序列以及 CDS 序列, PCR 产物运用琼脂糖凝胶电泳检测。然后利用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒回收 PCR 产物。在所得到的物体中加入 0.2 μ L 的 *Taq* DNA polymerase (Tiangen) 72 $^{\circ}$ C 10 min 加 A, 然后用 pGEM-T Easy 克隆载体做 T 连接, 连接后的产物转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态中, 涂布到氨苄抗性的 LB 培养基上, 在 37 $^{\circ}$ C 恒温条件下培养 12~15 h, 跑胶筛选阳性克隆, 穿刺送到华大基因股份有限公司测序。利用 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒提取阳性的质粒备用。

3.4 CYS基因序列及其编码蛋白分析

本研究使用 Vector NTI Suite 9.0 软件挑选了所需要的基因片段, 运用 NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov)的在线数据库同源比对分析, 然后在 ExPaSy-Protparam (<http://expasy.org/tools/protparam.html>) 软件中分析了 CYS 基因的 cDNA 序列开放阅读框并且推测了它的氨基酸序列。使用 NCBI 模块中的 BlastP 软件 (<https://acronyms.thefreedictionary.com/BLASTP>), 以及 ProScale 软件分别对烟草目的基因氨基酸序列进行了蛋白质的保守区及疏水性的预测。用 TMHMM-2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)阐明了其蛋白序列的跨膜区。利用 SWISS-MODEL 软件(<http://www.swissmodel.expasy.org/interactive>)构建了 CYS 基因同源建模的 3D 蛋白模型。在 MEGA4 (www.megasoftware.net/mega4/)在线软件中将烟草 CYS 基因编码的氨基酸序列与其他相关植物氨基酸序列进行比对, 比较分析与烟草 CYS 基因氨基酸序列亲缘性比较近的几种生物的氨基酸序列的同源性。

作者贡献

罗香怡是本研究的实验设计者和实验研究的执行人, 完成数据分析, 论文初稿的写作; 高洁铭和刘明慧参与实验设计, 试验结果分析; 刘宝龙是项目的构思者及负责人, 指导实验设计, 数据分析; 魏乐、宗渊和曹东完成指导论文写作和修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由青海省应用基础研究项目(2018-ZJ-762)和青海省科技成果转化专项-前补助(2018-NK-133)共同资助。

参考文献

- Liu S.C., Yan D.H., and Wei J., 2013, Bioinformatics analysis of selenocysteine methyltransferase gene in tea, *Xinan Nongye Xuebao* (Southwest China Journal of Agricultural Sciences), 26(6): 2221-2226 (刘声传, 鄢东海, 魏杰, 2013, 茶树硒代半胱氨酸甲基转移酶基因生物信息学分析, 西南农业学报, 26(6): 2221-2226)
- Liu X.L., Zhu M.Q., Cai W.J., Liu Y.N., Shi Y.N., and Qu C.Q., 2016, Comparison of extraction methods of total RNA from rhizome of *Atractylodes macrocephala*, *Fuyang Shifan Xueyuan Xuebao* (Journal of Fuyang Normal University (Natural Science)), 33(1): 46-49 (刘小丽, 朱梦晴, 蔡雯洁, 刘亚男, 石亚男, 屈长青, 2016, 白术根茎的总 RNA 提取方法的比较, 阜阳师范学院学报(自然科学版), 33(1): 46-49)
- Liu X.Q., Li J, Liu W.J., Zhang Y.L., Zheng T.T., and Wang Y.M., 2014, Research progress on utilization and extraction of tobacco protein, *Huagong Keji* (Science & Technology in Chemical Industry), 22(6): 67-70 (刘旭强, 李军, 刘维娟, 张艳林, 郑甜田, 王亚明, 2014, 烟草蛋白质的利用及提取的研究进展, 化工科技, 22(6): 67-70)
- Ma S.M., Luo J.Z., Wang D.X., Hu Y.X., Fan Z.Y., and Su J.E., 2018, Biological analysis of tobacco cysteine protease, *Anhui Nongye Kexue* (Anhui Agricultural Science), 593(16): 17-19 (马世明, 罗家佐, 王德勋, 户艳霞, 范志勇, 苏家恩, 2018, 烟草半胱氨酸蛋白酶的生物学分析, 安徽农业科学, 593(16): 17-19)
- Maciel F.M., Salles C.M.C., Retamal C.A., and Gomeset V.M., 2011, Identification and partial characterization of two cysteine proteases from castor bean leaves (*Ricinus communis* L.) activated by wounding and methyl jasmonate stress, *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(5): 1867-1875
- Roberts I.N., Caputo C., Criado M.V., and Funk C., 2012, Senescence-associated proteases in plants, *Physiologia Plantarum*, 145(1):130-139
- Slee E.A., Harte M.T., Kluck R.M., and Wolf B.B., 1999, Ordering the Cytochrome c-initiated Caspase Cascade: Hierarchical Activation of Caspases-2,-3,-6,-7,-8,and-10 in a Caspase-9-dependent Manner, *Journal of Cell Biology*, 144(2): 281-292
- Song J.H., and Zhang L.X., 2009, Research progress of plant transmembrane proteins, *Shengwuxue Zazhi* (Journal of Biology), 26(6): 62-64 (宋江华, 张立新, 2009, 植物跨膜蛋白研究进展, 生物学杂志, 26(6): 62-64)
- Wang X.F., Yang L.J., Dong X.N., Li Z.X., and Jiao C.J., 2011, Research progress in the synthesis and regulation of plant cysteine, *Zhiwu Shengli Xuebao* (Journal of Plant Physiology), 47(1): 37-48 (王小芳, 杨玲娟, 董晓宁, 李志孝, 焦成瑾, 2011, 植物半胱氨酸合成及调控研究进展, 植物生理学报, 47(1):37-48)
- Wang Y., Wang X.X., Quan H., Yu X.Y., Liu C., Xiao Q., Li W.F., Xiao Z.L., and Cao Z., 2018, Research and application of L-cysteine sensing detection, *HuaxueChuan'ganqi*(Chemical Sensor), 38(2): 23-33 (王煜, 王星星, 全浩, 于鑫垚, 刘楚, 肖情, 李文峰, 肖忠良, 曹忠, 2018, L-半胱氨酸传感检测的研究与应用, 化学传感器, 38(2):23-33)
- Xiao H.J., Yin Y.X., Chai W.G., and Gong Z.H., 2014, Silencing of the CaCP gene delays salt-and osmotic-induced leaf senescence in *Capsicum annuum* L, *International Journal of Molecular Sciences*, 15: 8316-8334
- Yin X.Y., Yang L, Luo W.L., Zhao S, Liu B, and Wang G.Y., 2018, Gene and protein sequence analysis of cysteine protease in

- tobacco, *Tianjin Nongye Kexue (Tianjin Agricultural Sciences)*, 24(9): 1-4 (殷雪艳, 杨柳, 罗万麟, 赵爽, 刘彪, 王光云, 2018, 烟草半胱氨酸蛋白酶的基因和蛋白序列分析, *天津农业科学*, 24(9): 1-4)
- Yu N.T., Zhou Q.L., Luo Z.W., Hu F.C., Zhang Z.L., and Liu Z.X., 2017, Improvement and analysis of cactus total RNA extraction method, *Guangdong Nongye Kexue (Guangdong Agricultural Sciences)*, 44(3): 75-79 (余乃通, 周启林, 罗志文, 胡福初, 张治礼, 刘志昕, 2017, 仙人掌总 RNA 提取方法的改进与分析, *广东农业科学*, 44(3):75-79)
- Zang Q.W., Wang C.X., Li X.Y., Guo Z.A., Jing R.L., Zhao J., and Chang X.P., 2010, Isolation and characterization of a gene encoding a polyethylene glycol-induced cysteine protease in common wheat, *Journal of Biosciences*, 35(3):379-388.
- Zhao J., Ke X., Xu C.H., Li J.Y., and Gong M., 2012, Effects of different light qualities on activity and gene expression of Caspase-like proteases in tobacco leaves, *Agricultural Science & Technology*, 338: 276-279
- Zong Y., Li S.M., Xi X.Y., Cao D., Wang Z., Wang R., and Liu B.L., 2019a, Comprehensive influences of overexpression of a MYB transcription factor regulating anthocyanin biosynthesis on transcriptome and metabolome of tobacco leaves, *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20): 5123
- Zong Y., Zhu X.B., Liu Z.G., Xi X.Y., Li G.M., Cao D., Wei L., Li J.M., and Liu B.L., 2019b, Functional MYB transcription factor encoding gene AN2 is associated with anthocyanin biosynthesis in *Lycium ruthenicum* Murray, *BMC Plant Biol.*, 19: 169