

doi:10.3969/j.issn.1672-5565.2014.01.03

甘蔗细胞色素 C 基因的电子克隆与分析

张玉叶, 黄宁, 肖新换, 苏炜华, 黄珑, 罗俊, 阙友雄*

(福建农林大学农业部福建甘蔗生物学与遗传育种重点实验室 国家甘蔗产业技术研发中心, 福州 350002)

摘要:以甘蔗类似细胞色素 C 的 EST 序列 CF576943.1 为探针, 通过电子克隆技术获得了甘蔗细胞色素 C 基因 (Cytochrome C, *Cyt C*) 的一条 cDNA 全长序列, 命名为 *ScCyt C*。用生物信息学方法对该基因氨基酸序列与组成、亚细胞定位、跨膜区与信号肽、疏水性/亲水性、蛋白质二、三级结构以及功能等进行分析与预测。结果表明: *Cyt C* 基因全长 1 073 bp, 编码 112 个氨基酸, 该基因位于细胞质, 为非分泌型蛋白, 无规卷曲为主要二级结构原件, 含有 1 个保守功能域, 主要功能为翻译并且在不同植物中具有高度保守性。电子表达分析结果显示, 该基因在甘蔗各个组织均有表达, 其中在茎和根中的表达量比其他组织类型中表达量高, 此外, 该基因的表达可能受到低温的调控。为甘蔗细胞色素 C 基因的结构及其功能的研究奠定了一定的基础。

关键词:甘蔗; *Cyt C* 基因; 电子克隆; 生物信息学; 电子表达分析

中图分类号:TS242.1.Q753 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-5565(2014)-01-010-08

Electronic cloning and characterization of sugarcane *ScCyt C* gene using bioinformatics tools

ZHANG Yuye, HUANG Ning, XIAO Xinhuan, SU Weihua, HUANG Long, LUO Jun, QUE Youxiong*

(Key Laboratory of Sugarcane Biology and Genetic Breeding, Ministry of Agriculture, Fujian Agriculture and Forestry University
Sugarcane Research & Development Center, China Agriculture Research System, Fuzhou 350002, China)

Abstract: The full-length cDNA sequence of one sugarcane cytochrome C gene (*ScCyt C* gene) was obtained by in silico cloning using CF576943.1 sequence from *Saccharum sinense* as the probe sequence. Some characters of the *ScCyt C* gene encoding amino acid, including the composition of amino acid sequence, physical and chemical properties, subcellular localization, transmembrane domain, hydrophobicity / hydrophilicity, secondary and tertiary structure of protein plus functional domains, were analyzed by bioinformatics tools. The results showed that the full-length *ScCyt C* gene from sugarcane is 1073 bp which encodes a polypeptide of 112 amino acids. The encoded protein of *ScCyt C* gene, with a conserved domain sequences, is soluble and located in cytoplasm or chloroplast, and the corresponding secondary structure of this protein is mainly composed of random coil. The function of the *ScCyt C* protein is mainly involved with translation. It is highly conservative in different plants. Electronic expression analysis revealed that the *ScCyt C* gene is constitutively expressed in all the types of sugarcane tissues, and the expression of this gene in the stem and root of sugarcane is much higher than that in all the other types of sugarcane tissues. In addition, the expression of this gene is regulated under the stress of low temperature. The results obtained in this study will provide reference for molecular cloning, structural analysis and function identification of *ScCyt C* gene in sugarcane.

Keywords: Sugarcane; *Cyt C* gene; In silico cloning; Bioinformatics; Electronic expression analysis

细胞色素 C (Cytochrome C, *Cyt C*) 是呼吸链中一个重要的电子传递体, 由核基因编码的多肽和线

粒体编码的亚铁血红素组成, 其主要功能是通过分子中的半胱氨酸巯基与血红素共价结合, 通过血红

收稿日期: 2013-12-01; 修回日期: 2014-01-06.

基金项目: 国家自然科学基金 (31340060); 教育部博士点基金 (20103515120006); 福建农林大学杰出青年基金 (xjq201202)。

作者简介: 张玉叶, 女, 硕士研究生, 研究方向: 作物基因资源挖掘及其功能鉴定; E-mail: 20723521@qq.com.

* 通信作者: 阙友雄, 硕导, 副研究员, 理学博士, 研究方向: 甘蔗应用基因组学研究; E-mail: queyouxiong@126.com.

素辅基中心铁离子价态的变化在细胞色素 C 还原酶 (Cytochrome c reductase) 和细胞色素 c 氧化酶 (Cytochrome c oxidase) 之间传递电子^[1-3]。Cyt C 松散地结合在富含不饱和脂肪酸的线粒体内膜外侧心磷脂上,表面带正电荷,无法自由通过线粒体外膜^[4]。Cyt C 一般由 103~113 个氨基酸组成,其分子量小,多介于 1.2~1.3 kDa。Cyt C 蛋白含有 18 个赖氨酸,属于碱性蛋白质,等电点 10.5~10.8。该蛋白的性质很稳定,这是由于在 Cyt C 中,血红素辅基 heme 除与轴向配体甲硫氨酸和组氨酸形成配位键外,还通过两个半胱氨酸形成两个硫醚键和肽链共价相连^[5]。此外,前人研究还发现,Cyt C 在诱导细胞凋亡^[6-9]和抗氧化^[10]中也起着重要的作用。另一方面,鉴于 Cyt C 在生物进化中的高度保守性,可以应用于生物系统进化分类。综合以上,Cyt C 的相关研究一直受到生物学研究中的热点问题之一,但在甘蔗中 Cyt C 的研究还处于初步阶段,通过文库的构建有测到相似基因的 EST^[11],但具体的功能验证研究仍然需要完善。

电子克隆 (In silico cloning) 是一种基于 EST 或基因组的序列组装和拼接,快速地获得部分或全长 cDNA 的技术。该技术首先被运用在人、鼠和水稻等 EST 丰富的模式生物中^[12-13],随后在其它植物中此技术得到广泛运用,在甘蔗中也有相关报道^[14-15]。电子表达分析 (Electronic expression analysis) 是通过整合某物种中特定基因的所有相关表达序列标签 (Expression sequence Tag, EST) 信息,从而获得该基因表达相关信息的一种新型基因表达分析技术^[16-17]。目前,电子表达分析常与电子克隆技术相结合,共同应用于新基因挖掘和基因功能分析,已被成功应用于多种植物目标基因的表达分析,此技术在甘蔗中也得到逐步运用^[15-16]。

本研究利用电子克隆方法,以甘蔗类似细胞色素 C 的 EST 序列 CF576943.1 为探针,通过电子克隆技术获得了甘蔗细胞色素 C 基因,用生物信息学方法对该基因氨基酸序列与组成、亚细胞定位、跨膜区与信号肽、疏水性/亲水性、蛋白质二、三级结构以及功能等进行分析与预测,而后采用电子表达分析技术分析该基因表达情况。研究为深入解析甘蔗细胞色素 C 基因的结构与功能提供了参考与借鉴依据。

1 材料和方法

1.1 甘蔗 ScCyt C 基因序列获得

以甘蔗类似细胞色素 C 的 EST 序列 CF576943.1

为探针,使用 Blastn 检索甘蔗 EST 数据库,选取与探针序列同源性较高的甘蔗 EST 序列,使用在线工具 CAP3 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>) 进行拼接,以拼好的 contig 重叠群为新探针,再次比对检索,直到没有新的 EST 可供拼接为止^[15-16]。将拼接所得的 contig 用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 软件查找其开放读码框,有完整的开放读码框则为基因序列。

1.2 生物信息学软件分析

利用 ExPASy 中 ProtParam pI/Mw (http://web.expasy.org/compute_pi/) 分析基因的理化性质; SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 分析编码蛋白的信号肽有无; 利用 ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>) 分析蛋白的亲疏水性; 利用 Profun 2.2 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ProtFun/>) 预测蛋白的功能; 利用 Psort (<http://www.psort.org/>) 分析查看蛋白的亚细胞定位; SWISSMODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 进行蛋白质三级结构预测。最后利用 Blast 查找同源氨基酸序列。

1.3 甘蔗 ScCyt C 基因的电子表达分析

将得到的同探针序列同源性较高的甘蔗 EST 序列在 NCBI 中逐一分析; 根据这些 EST 序列的登陆信息得出所有 EST 序列组织来源,最后计算出在不同组织中的出现比例及各 EST 序列来源材料受到的生物或非生物胁迫情况,分析该基因的组织特异性表达情况和不同胁迫条件下的表达特性^[14-16]。

2 结果与分析

2.1 甘蔗 ScCyt C 基因的获得

以甘蔗类似细胞色素 C 的 EST 序列 CF576943.1 为探针,在甘蔗 EST 数据库中比对检索,选中 1 条同源性高的甘蔗 EST 序列。CAP3 拼接重组该 EST 聚类 (Unigene) 的 28 条非冗余甘蔗 EST 后获得 2 条重叠群序列,通过 ORF Finder 软件和 Blast 分析比对,最终得到一个全长为 1 073 bp 的基因序列。该 cDNA 序列具有完整的开放阅读框 (ORF, 377~715 bp), 编码 112 个氨基酸,说明此序列为一条完整的甘蔗细胞色素 C 基因的 cDNA 序列,命名为 ScCyt C。图 1 为电子克隆所得的序列。

```

1 CTCGGCGAGCCCCGACCAAAACCCGAGACGCGTCCCACGAAATGCCCTAGCACGTAGCGC
61 CGCCGTCCCCAATCGAACGGGGCGTGGGGGCCACGCTTCCCGTGCACGCGCCGCCAC
121 GGCTTCCTTATTCTCCAAGCCACGGAAACCTTCTCGAACCTCCCTTTCCCATTTCTAC
181 TCCTTTCCACCCTCGGCCCTCCGCTCTTCTCAGGGGACGTTCCGTACTTCCATGACCT
241 GAGCACTCCAAGCCTGGTCTATAGAACAGCCGGGTCCCTCGGAATTCGGCGCAAGTCCA
301 AGGGCACACCAGAAGTTGCGGTTGGCTTCCCTCTTCTCCTCCGTCGGCTCAGACTCAG
361 ATCTCTGCTTGGCGCGATGGCGTCTTCTCGGAGGCTCCCCCGGGAACCCCAAGGCGGG
      M A S F S E A P P G N P K A G
421 CGAGAAGATCTTCAAGACCAAGTGCAGCAGTGCCACACGGTGCATAAGGGCGCCGCCA
      E K I F K T K C A Q C H T V D K G A G H
481 CAAGCAAGGTCCAACCTGAATGGTCTTTTGGGAGGCAGTCGGGTACCACCGCAGGCTA
      K Q G P N L N G L F G R Q S G T T A G Y
541 CTCCTACTCTGCGGAAACAAAAACAAGGCTGTGGTCTGGGAGGAGAACAACCTTTGTATGA
      S Y S A G N K N K A V V W E E N T L Y E
601 GTACCTGCTTAACCCTAAAAAGTACATTCTGGAACCAAGATGGTCTTCCCTGGGCTGAA
      Y L L N P K K Y I P G T K M V F P G L K
661 GAAGCCGAGGAGCGTGCTGATCTATCGCGTACCTGAAGGAAGCAATGCATAGTGCAA
      K P Q E R A D L I A Y L K E A T A *
721 TGACATGCCTTTGCCATGAAGAGATAAATTCGTTTTTGCAGTTTAAATAAGACATTTTAG
781 ACAATTTGGGTCACCTCTGTTTGAACAGGGTGCAATCCACGCTCTCACTATTTTCGTTCCGTA
841 TGGTGTGGTATTGAATGCCTAGGTGTTTAGCTGTGCACAAAAAACAGTTAAACTTTGAC
901 GGCTCCTATTTCAACTGCTGGAGAAATGCCAGTGCCTATTTTGGACCAACGATTGCGG
961 AACTGAAAATCTGGATGGAATGCATCCATTTTGAACAAAAACAACCCNATCTATTCTCTCA
1021 ATAACTACACACTTATCTTNTCTTTTCTAACACACTATCACACCCTCTAA

```

图1 电子克隆获得的甘蔗 *ScCyt C* 基因的 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列 (* 终止密码子)

Fig. 1 Nucleotide acid sequence and deduced amino acid sequence of sugarcane *ScCyt C* gene obtained by in silico cloning (* stop codon)

2.2 甘蔗 *ScCyt C* 基因的生物信息学分析

2.2.1 甘蔗 *ScCyt C* 基因编码氨基酸的一级结构预测

通过在线工具 ExPASy 对甘蔗 *ScCyt C* 基因编码氨基酸进行一级结构预测(见表1),可知,在甘蔗中 *Cyt C* 的一些一级结构预测结构与前人在其他不同植物中研究的 *Cyt C* 表现普遍的理化性质大致相符^[5]。

2.2.2 甘蔗 *ScCyt C* 蛋白二级结构预测和分析

通过在线软件 GOR IV 对甘蔗 *ScCyt C* 蛋白进行二级结构预测(见图2,表2),结果显示无规则卷曲所占比例最大 65.18%,主要集中在 1~50aa。 α -螺旋和延伸链所占的比例相差不远分别为 15.18% 和 19.64%。 α -螺旋主要集中在 100~110aa。

表1 *ScCyt C* 的一级结构预测分析

Table1 Primary structure analysis of *ScCyt C*

一级结构特性	预测结果
编码的氨基酸数/个	112
等电点 (PI)	9.46
分子量 (MW) / Da	12 165.9
负电荷残基 (Asp+Glu)	9
正电荷残基 (Arg +Lys)	16
分子式	$C_{545}H_{852}N_{148}O_{160}S_4$
不稳定系数(II)	26.14
平均疏水性 (GRAVY)	-0.651
脂肪系数 (AI)	59.38

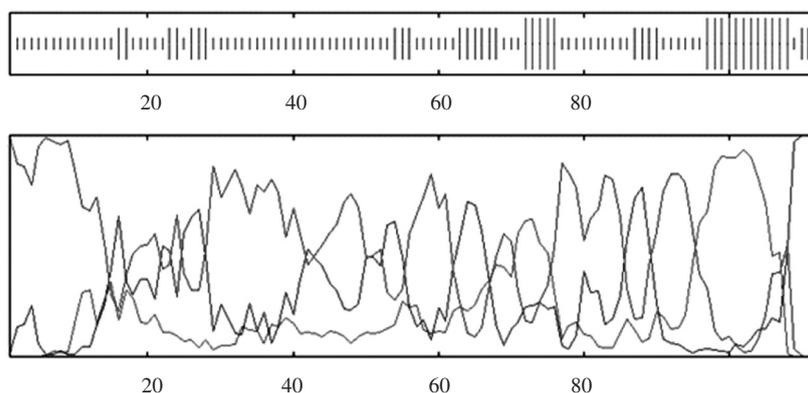


图2 甘蔗 *ScCyt C* 蛋白二级结构预测

Fig. 2 Predicted secondary structure of sugarcane *ScCyt C* protein

注: 短竖线区, 无规则卷曲; 中竖线区, 延伸链; 长竖线区, α -螺旋。

Notes: Short vertical bar area; Random coil; In the vertical bar area; Extended strand; Long vertical bar area; Alpha helix.

表 2 甘蔗 ScCyt C 蛋白二级结构预测分析

Table 2 Secondary structure prediction of sugarcane ScCyt C protein

二级结构类型	氨基酸残基数目(个)	百分比(%)
α-螺旋 Alpha helix	17	15.18
延伸链 Extended strand	22	19.64
无规则卷曲 Random coil	73	65.18
β-螺旋 Beta turn	0	0

2.2.3 甘蔗 ScCyt C 蛋白信号肽预测和分析

ScCyt C 基因的蛋白序列进行信号肽预测结果如表 3、图 3 所示:第 23 位半胱氨酸残基具有最高的原始剪切位点分值 0.110 和第 1 位甲硫氨酸具有最高的信号肽分值 0.112,第 12 位脯氨酸残基具有最高的综合剪切位点分值 0.112。由于最后算得氨基酸残基的加权平均值较小 0.112 ($\ll 0.5$),则推测 ScCyt C 基因所编码的蛋白不存在信号肽,说明该蛋白为非分泌性蛋白,在细胞质中合成后不能进行蛋白转运。与前人研究该基因在线粒体内膜外侧上,不能自由通过线粒体外膜的结果相符^[4]。

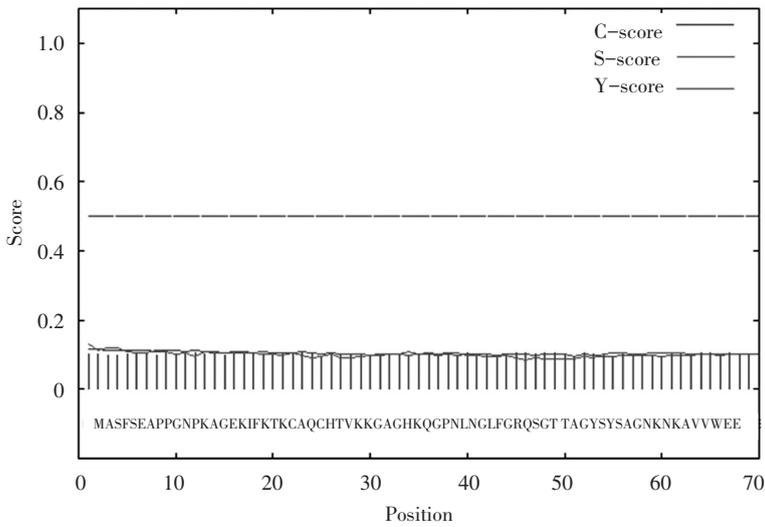


图 3 甘蔗 ScCyt C 蛋白信号肽预测

Fig. 3 Signal P-NN prediction for sugarcane ScCyt C protein

表 3 甘蔗 ScCyt C 蛋白信号肽预测

Table 3 Signal P-NN prediction for sugarcane ScCyt C protein

指标	位点	分值	有无信号肽
max. C	23	0.110	
max. Y	12	0.112	
max. S	1	0.129	
mean S	1-11	0.111	
D	1-11	0.112	无

注: C score:原始剪切位点的分值; S score:信号肽的分值; Y score:综合剪切位点的分值; S-mean :信号肽分值的平均值; D score: S mean 和 Y-max 的加权平均值。

Notes: C score: Scores of Putative cleavage site; S score: Scores of Signal peptide; Y score: Scores of Synthesis cleavage site S-mean : the average of the S-score; D score: A weighted average of the S-mean and the Y-max scores.

性预测结果如图 4 所示,第 107 位具有最高分值为 0.700,则疏水性最强;第 96 位具有最低分值-2.122,则亲水性最强。Cyt C 基因所编码蛋白序列 GRAVY 值为-0.651,故推测甘蔗 ScCyt C 是一种亲水蛋白。

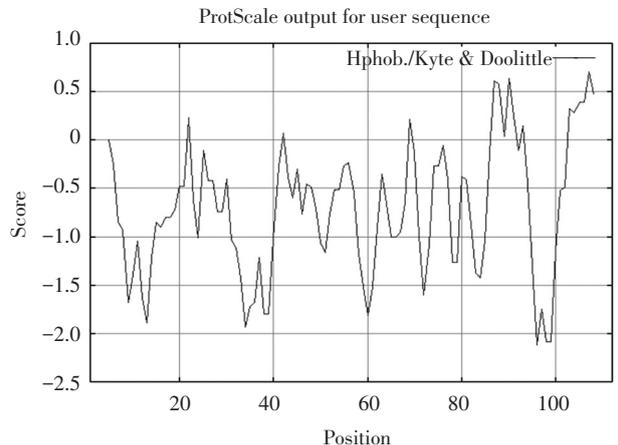


图 4 甘蔗 ScCyt C 蛋白氨基酸疏水性/亲水性预测
Fig. 4 Predicted hydrophobicity/hydrophilicity of the amino acid sequence of sugarcane ScCyt C protein

2.2.4 甘蔗 ScCyt C 蛋白疏水性/亲水性的预测和分析

ScCyt C 基因所编码氨基酸序列的疏水性/亲水

2.2.5 甘蔗 ScCyt C 蛋白质三级结构预测

甘蔗 ScCyt C 蛋白质三级结构预测结果如图 5 所示;ScCyt C 的空间结构以无规则卷曲和螺旋为

主。将该蛋白与玉米、粟米和高粱中 Cyt C 蛋白的三级空间结构虚拟图,结果显示甘蔗的三级空间结构在四个近缘物种中高度相似。

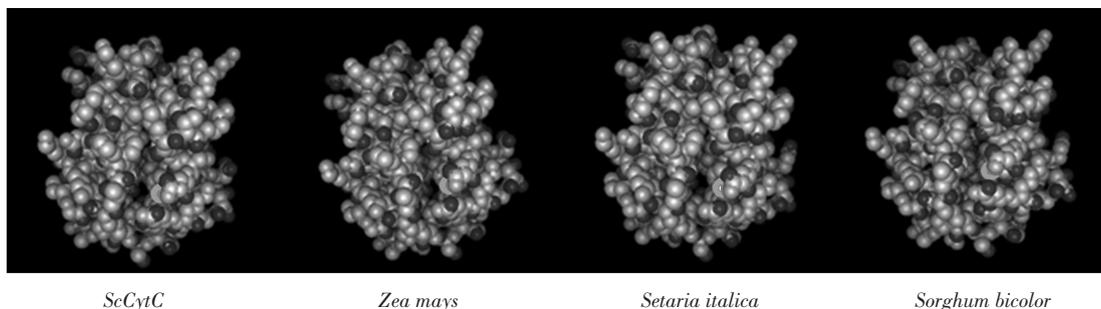


图 5 甘蔗 ScCyt C 蛋白三级结构预测

Fig.5 Predicted third structure of sugarcane ScCyt C protein

2.2.6 甘蔗 ScCyt C 蛋白的功能预测

甘蔗 ScCyt C 蛋白功能预测结果如表 4 所示,该蛋白的最主要功能为翻译,也有一定可能性参与了复制与转录、中间代谢、脂肪酸新陈代谢、能量新陈代谢。

表 4 甘蔗 ScCyt C 蛋白功能预测

Table 4 Function prediction for sugarcane ScCyt C protein

功能类别	可能性
翻译(Translation)	6.060
复制与转录(Replication_and_transcription)	1.265
中间代谢(Central_intermediary_metabolism)	1.108
脂肪酸新陈代谢(Fatty_acid_metabolism)	1.101
能量新陈代谢(Energy_metabolism)	0.807

2.2.7 甘蔗 ScCyt C 蛋白的亚细胞定位

ScCyt C 蛋白亚细胞定位预测结果如表 5 所示,甘蔗 ScCyt C 蛋白可能定位于细胞质或叶绿体中。

由于细胞色素 C 是生物氧化的一个非常重要的电子传递体,在线粒体和叶绿体中,细胞色素常常结合在电子传递和相关代谢途径的复合物酶中,则预测结果与实际相符。

表 5 甘蔗 ScCyt C 蛋白的亚细胞定位

Table 5 Subcellular location of ScCyt C protein

亚细胞定位	概率
细胞质(cytoplasm)	0.650
叶绿体基质(chloroplast stroma)	0.200
叶绿体内囊体膜(chloroplast thylakoid membrane)	0.200
叶绿体内囊体空间(chloroplast thylakoid space)	0.200

2.2.8 甘蔗 ScCyt C 蛋白的保守结构域分析

ScCyt C 蛋白的保守结构域预测结果如图 6 所示,甘蔗 ScCyt C 蛋白包含 Cytochrom C superfamily 一个保守结构域。

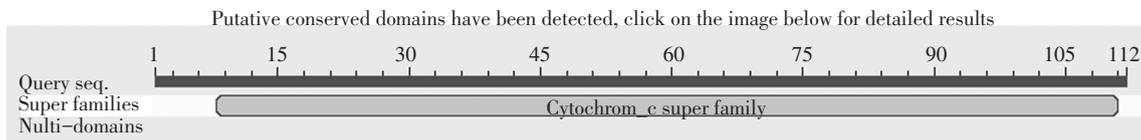


图 6 甘蔗 ScCyt C 蛋白的保守结构域分析

Fig.6 Conserved domain prediction of ScCyt C protein

2.2.9 甘蔗 ScCyt C 蛋白的同源氨基酸序列比对与进化分析

使用 NCBI 中的 Blastp 程序,对甘蔗 ScCyt C 蛋白的氨基酸进行同源性分析。选择玉米(Zea mays_gb|NP_001170028.1||)、粟米(Setaria italica_gb|XP_004962043.1||)、高粱(Sorghum bicolor_gb|XP_

002439820.1||)、马铃薯(Solanum tuberosum_gb|AFX66977.1||)番茄(Solanun lycopersicum_gb|XP_004230430.1||)、水稻(Oryza sativa Japonica Group_gb|NP_00105 5578.1||)、向日葵(Helianthus annuus_gb|P00070.3|)和二穗短柄草(Brachypodium distachyon_gb|XP_003568426.1|)进行分析,蛋白的

氨基酸序列相似性分别为 99 %、99 %、98%、94%、94%、93 %、92%和 91 %。

用软件 DNAMAN 软件多重地对甘蔗与上述 8 个近缘物种中的 Cyt C 蛋白的氨基酸序列(图 7),并输出有根系统进化树(图 8)。从图 7 可以看出,同属单子叶植物的甘蔗和玉米同源性最高。图 8 系

统进化树显示:单子叶植物甘蔗、玉米、粟米和粟米为一分支,同属双子叶植物的番茄、马铃薯和甘蔗同源性较低,但不同物种间同源性高达 90%以上,仅有几个氨基酸的差别。因此,该基因在不同物种间具有高度的保守性,它们对应的蛋白属于同一个家族。

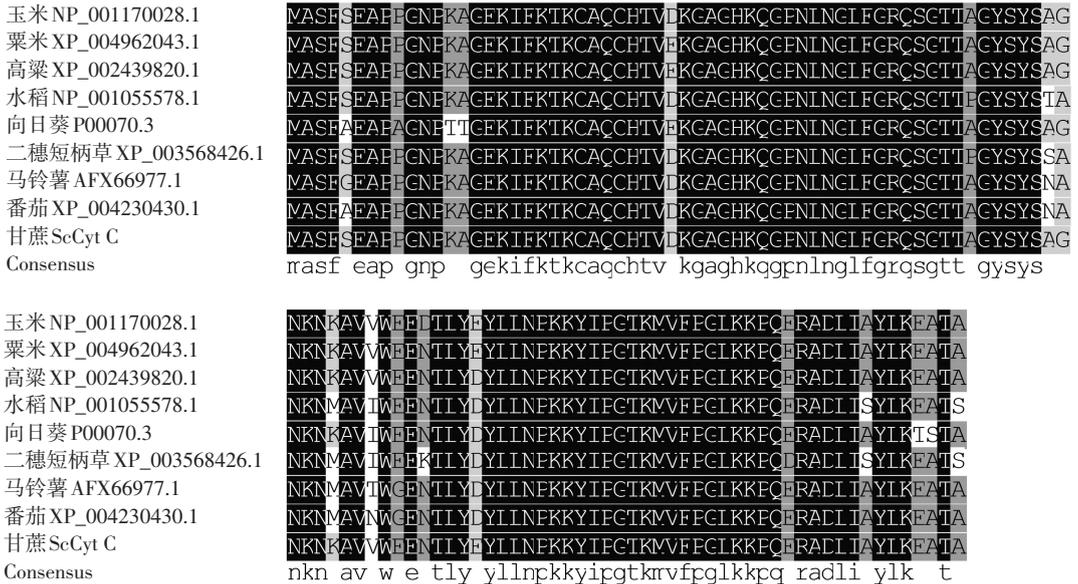


图 7 甘蔗 ScCyt C 蛋白与其它植物种蛋白的氨基酸序列对比

Fig.7 Homology analysis of ScCyt C encodes amino acid sequences and those from other plant species

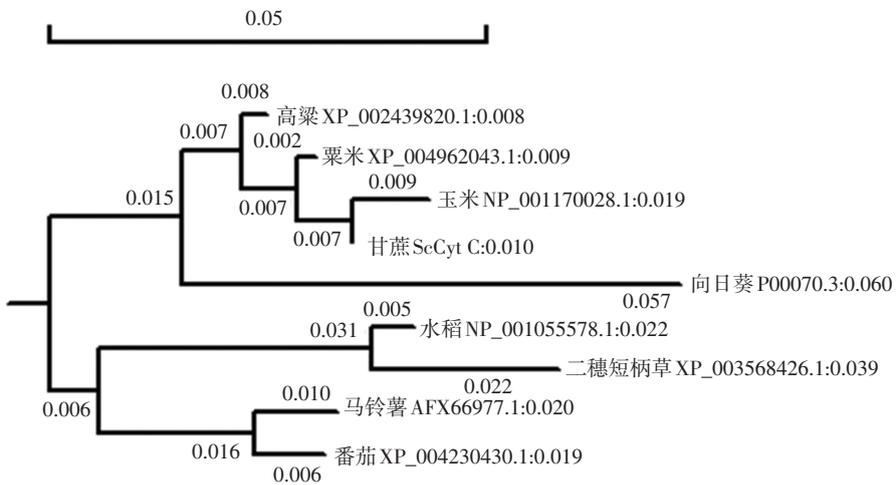


图 8 九种植物基于 Cyt C 基因氨基酸序列的系统进化树

Fig.8 Phylogenetic tree of nine plant species based on amino acid sequences of the Cyt C gene

2.3 甘蔗 ScCyt C 基因的电子表达分析

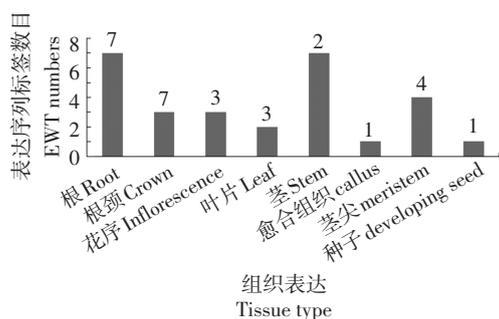
甘蔗 ScCyt C 基因的电子表达结果如表 6 和图 9所示,在甘蔗根尖、根颈、花序、叶片、茎、全株和

芽中组成型表达,与其他组织类型中表达量相比,其中在根和茎中的表达量高。此外,该基因的表达受低温调控(见表 6,图 9)。

表 6 甘蔗 *ScCyt C* 基因电子表达分析的 EST 分类结果

Table 6 EST classification results analysis

基因名	EST 序列	组织类型	数量	胁迫类型	数量
<i>ScCyt C</i>	28	根 (root)	7		
		根颈 (crown)	3		
		花序 (inflorescence)	3		
		叶片 (leaf)	2		
		茎 (stem)	7		
		愈合组织 (callus)	1	lowtemperature	1
		茎尖 (meristem)	4		
		种子 (developing seed)	1		

图 9 甘蔗 *ScCyt C* 基因电子表达分析结果Fig.9 The electronic expression analysis result of *ScCyt C* gene

3 结 论

电子克隆和电子表达分析技术由于其简便高效的特性已经被广泛应用于已用于动植物基因克隆及其表达分析^[11-18]。甘蔗 EST 数据库中包含有大约 28 万条 EST,已经能够非常好地覆盖甘蔗的全基因组,这也说明了基于电子克隆和电子表达分析技术克隆目标基因并对其表达特性进行分析的可行性和准确性。本研究通过电子克隆技术获得了甘蔗细胞色素 C 基因的一条 cDNA 全长序列,生物信息学方法结果表明:甘蔗 *Cyt C* 基因全长 1 073 bp,编码 112 个氨基酸,蛋白质结构稳定,分子量为 1.29 kDa,氨基酸带正电荷,偏碱性。该基因位于细胞质或叶绿体中,编码蛋白为非分泌型亲水蛋白,无规卷曲为主要二级结构原件,含有 1 个保守功能域,主要功能为翻译。分析还揭示,甘蔗细胞色素 C 是分子量小,带正电荷,稳定的亲水蛋白,这与前言研究结果是相似的^[4-5]。甘蔗的 *Cyt C* 蛋白与其他植物同源序列比对,表现出高度保守性,其三级结构与同为 C4 单子叶植物的玉米、粟米和高粱极为相似,与单子叶植物马铃薯、番茄的同源性也高达 90% 以上,这从一定程度上说明 *Cyt C* 蛋白可以成为研究生物进化的代表性蛋白。另一方面,本研究利用 Unigene 数据库分

析了甘蔗细胞色素 C 基因的电子表达情况,检索到 28 条同源性较高的 EST 序列,该基因在甘蔗各个组织均有表达,其中在茎和根中的表达量比其他组织类型中表达量高,此外,该基因的表达可能受到低温的调控。但是,鉴于 *Cyt C* 基因与电子传递链相关,定位于叶绿体,理论上在叶片中的表达量应较高,故电子表达分析的结果需进一步通过定量 PCR 或者 Northern 杂交等技术分析的修正与完善。本研究为进一步深入研究甘蔗细胞色素 C 基因的结构及其功能奠定了一定的基础。

参考文献 (References)

- [1] DOPNER S, HILDEBRANDT P, ROSELL F I, et al. The structural and functional role of lysine residues in the binding domain of cytochrome c in the electron transfer to cytochrome c oxidase [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1999, 261, (2): 379-91.
- [2] WANG Y, MARGOLIASH E. Enzymic activities of covalent 1:1 complexes of cytochrome c and cytochrome c peroxidase [J]. *Biochemistry*, 1995, 34 (6): 1948-58.
- [3] MEI H, WANG K, PEFFER N, et al. Role of configurational gating in intracomplex electron transfer from cytochrome c to the radical cation in cytochrome c peroxidase [J]. *Biochemistry*, 1999, 38(21): 6846-54.
- [4] 马伟科, 张宏艳. 线粒体细胞色素 C 与细胞凋亡 [J]. *实用医学杂志*, 2007, 23(23): 3786-3788.
MA Weike, ZHANG Hongyan. The relationship of cytochrome C in the mitochondrial and cell death [J]. *The Journal of Practical Medicine*, 2007, 23(23): 3786-3788.
- [5] 马志科, 管林森. 细胞色素 C 在生物医学方面的研究进展 [J]. *畜牧兽医杂志*, 2006, 25(5): 30-35.
MA Zhike, ZAN Linsen. The advancement of cytochrome C on biology medicine [J]. *Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2006, 25(5): 30-35.
- [6] 孙英丽, 赵允, 刘春香, 等. 细胞色素 C 能诱导植物细胞编程性死亡 [J]. *植物学报*, 1999, 41(4): 379-383.
SUN Yingli, ZHAO Yun, LIU Chunxiang, et al. Cytochrome c can induce programmed cell death in plant cells [J]. *Acta Botanica Sinica*, 1999, 41 (4): 379-383.
- [7] 王艳杰, 邓雯, 张鹏飞. 细胞色素 C 与细胞凋亡研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2012, 33(7): 89-92.
WANG Yanjie, DENG Wen, ZHANG Pengfei. The research progress of cytochrome c about cell death [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2012, 33(7): 89-92.
- [8] LI K, LI Y, SHELTON J M, et al. Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis [J]. *Cell*, 2000, 101 (4): 389-99.

- [9] LIU Z, LIN H, YE S, et al. Remarkably high activities of testicular cytochrome c in destroying reactive oxygen species and in triggering apoptosis [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006, 103, (24): 8965-70.
- [10] ZHAO Y, WANG Z B, XU J X. Effect of cytochrome c on the generation and elimination of O_2 and H_2O_2 in mitochondria [J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278 (4): 2356-60.
- [11] CASU R E, DIMMOCK C M, CHAPMAN S C, et al. Identification of differentially expressed transcripts from maturing stem of sugarcane by in silico analysis of stem expressed sequence tags and gene expression profiling [J]. Plant Molecular Biology, 2004, 54(4): 503-17.
- [12] 王海涛, 畅继武, 马小兵, 等. 人和大鼠自噬相关新基因 WIPI-3 的电子克隆和序列分析 [J]. 现代生物医学进展, 2006, 6(4): 16-21.
WANG Haitao, CHANG Jiwu, MA Xiaobing, et al. Identification and characterization of human and rat autophagy-related novel gene WIPI3 in silico [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2006, 6(4): 16-21.
- [13] 黄骥, 王建飞, 张红生, 等. 水稻葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 cDNA 的电子克隆 [J]. 遗传学报, 2002, 29(11): 1012-1016.
HUANG Ji, WANG Jianfei, ZHANG Hongsheng, et al. In silico cloning of glucose-6-phosphate dehydrogenase cDNA from rice (*Oryza Sativa* L.) [J]. Acta Genetica Sinica, 2002, 29(11): 1012-1016.
- [14] 黄宁, 张玉叶, 苏亚春, 等. 甘蔗天冬氨酸半醛脱氢酶基因的电子克隆与分析 [J]. 生物信息学, 2013, 11(2): 91-99.
HUANG Ning, ZHANG Yuye, SUE Yachun, et al. Electronic cloning and characterization of sugarcane ScASADH gene using bioinformatics tools [J]. Chinese Journal of Bioinformatics, 2013, 11(2): 91-99.
- [15] 张玉叶, 黄宁, 阙友雄, 等. 甘蔗苏氨酸脱氨酶基因的克隆与表达分析 [J]. 热带作物学报 (待发表).
ZHANG Yuye, HUANG Ning, QUE Youxiong, et al. Cloning and expression analysis of threonine deaminase gene in sugarcane [J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2014, 35(1): 1-7.
- [16] 黄宁, 张玉叶, 阙友雄, 等. 甘蔗二氨基庚二酸异构酶基因的克隆与表达分析 [J]. 热带作物学报, 2013, 34(11): 2200-2208.
HUANG Ning, ZHANG Yuye, QUE Youxiong, et al. Cloning and expression analysis of a diamino pimelate epimerase gene in sugarcane [J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2013, 34(11): 2200-2208.
- [17] 上官凌飞, 王晨, 房经贵, 等. 利用 GenBank 中大量葡萄 EST 序列分离有效基因的电子表达分析平台 [J]. 中国农业科学, 2011, 44(13): 2748-2759.
SHANGGUAN Lingfei, WANG Chen, FANG Jinggui, et al. Isolation of effective genes with digital northern platform of NCBI grapevine (*Vitis vinifera* L.) EST sequences [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2011, 44(13): 2748-2759.
- [18] 王丽芳, 杜希华, 于涌鲲, 等. 番茄 WRKY 转录因子基因片段的克隆及序列分析 [J]. 中国农学通报, 2009, 25(23): 70-73.
WANG Lifang, DU Xihua, YU Yongkun, et al. Cloning and Sequence Analysis of WRKY Transcription Factor Gene Fragment in tomato [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2009, 25(23): 70-73.