

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2024.03.020

## 拟南芥 *TRX-h5* 基因的克隆和表达分析

穆秀杰, 张林林, 韩毅

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

**摘要:** 硫氧还蛋白(TRX-h)是一类催化二硫键还原的小分子蛋白,在调控氧化应激响应中发挥重要作用。为了研究硫氧还蛋白的结构及其功能,文章以野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) Columbia(Col-0)为研究材料,通过反转录-聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)技术获得 *TRX-h5* 基因的编码序列(coding sequence, CDS),体外构建 pET28a(+)-*TRX-h5* 及 pET28a(+)-*TRX-h5M* (第 39 位和第 42 位半胱氨酸位点突变)的原核表达载体,转化至大肠杆菌感受态细胞 BL21(DE3)中,诱导后经镍柱纯化得到带有 6 个 His 标签的融合蛋白。通过 SDS-PAGE 电泳技术检测到 14 kDa 处的目的条带,与理论值预测一致。运用生物信息学分析得出, *TRX-h5* 基因编码 118 个氨基酸,相对分子质量为 13 122.32,理论等电点为 5.19,该蛋白的不稳定参数为 26.74,属于稳定性蛋白。点突变分析发现, *TRX-h5* 的第 39 位和第 42 位半胱氨酸位点决定了该蛋白的催化活性,为进一步探究 *TRX-h5* 的蛋白功能和高等植物氧化还原系统的研究提供了新思路。

**关键词:** *TRX-h5* 基因; 基因克隆; 生物信息学分析; 原核表达

中图分类号: Q786

文献标志码: A

文章编号: 1003-5060(2024)03-0411-06

### Cloning and expression analysis of *TRX-h5* gene in *Arabidopsis thaliana*

MU Xiujie, ZHANG Linlin, HAN Yi

(School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

**Abstract:** Thioredoxin(TRX-h) is a small molecular protein that catalyzes the reduction of disulfide bonds and plays an important role in regulating the response to oxidative stress. In order to study the structure and function of TRX-h, wild type *Arabidopsis thaliana* Columbia(Col-0) was used as the research material. The coding sequence(CDS) of *TRX-h5* gene was obtained by reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR). The prokaryotic expression vectors of pET28a(+)-*TRX-h5* and pET28a(+)-*TRX-h5M*(mutation at cysteine sites 39 and 42) were constructed *in vitro* and transformed into *E. coli* competent cell BL21(DE3). After induction, the fusion protein with six His tags was purified by nickel column. SDS-PAGE detected the target band at 14 kDa, which was consistent with the theoretical prediction. Bioinformatics analysis showed that *TRX-h5* gene encoded 118 amino acids, the relative molecular weight was 13 122.32, the theoretical isoelectric point was 5.19, and the instability parameter of the protein was 26.74, which indicated that the protein was a stable protein. Point mutation analysis showed that the cysteine sites at 39 and 42 of *TRX-h5* determined the catalytic activity of the protein, which provided a new idea for further exploring the protein function of *TRX-h5* and the redox system of higher plants.

**Key words:** *TRX-h5* gene; gene cloning; bioinformatics analysis; prokaryotic expression

收稿日期: 2022-11-26; 修回日期: 2022-12-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31300225)

作者简介: 穆秀杰(1997—), 女, 安徽阜阳人, 合肥工业大学硕士生;

韩毅(1982—), 男, 安徽马鞍山人, 博士, 合肥工业大学教授, 硕士生导师。

## 0 引言

干旱、重金属、紫外线等不利因素会影响植物自身的生长、发育。为了适应环境,植物演化出一套完整的氧化还原调节系统来维持体内内环境氧化还原的平衡。植物受到外界刺激时,会在体内产生大量的活性氧(reactive oxide species, ROS)分子,如过氧化氢、羟基自由基以及超氧阴离子等<sup>[1]</sup>。高水平的 ROS 对植物有毒害作用,ROS 的清除分为酶促系统和非酶促系统 2 种,得以维持细胞内氧化还原水平的稳态<sup>[2-4]</sup>。酶促系统包括超氧化物歧化酶、过氧化氢酶等;维生素 C、还原型谷胱甘肽、类黄酮等<sup>[5]</sup> 构成非酶促系统。近期研究表明,ROS 还可以作为信号分子<sup>[6]</sup>,参与病原体防御、调节气孔关闭及生长发育等过程。ROS 产生后,其自身作为信号分子激发磷酸化级联反应、钙信号及激素介导的信号通路,以此做出防御。因此,生物体内的 ROS 在一个合适的水平才得以维持细胞内生理生化反应的正常进行。

拟南芥硫氧还蛋白(TRX-h)是一个由 19 个基因编码的小分子蛋白,基因定位于细胞质、叶绿体、线粒体等,内质网和细胞核中也存在 TRX-h 蛋白<sup>[7]</sup>,但功能尚不清楚。TRX-h 基因家族成员的表达水平及表达模式各不相同,表明各自具有特异的功能<sup>[8]</sup>。拟南芥 TRX-h1 至 TRX-h5 mRNA 在地上器官(如幼叶、成熟叶、长角果、花芽、花)中丰度高,而茎中丰度低些。TRX-h2、TRX-h4 和 TRX-h5 在根中表达量很低,TRX-h1 和 TRX-h3 mRNA 在根中根本检测不到。通常情况下,TRX-h 蛋白以还原形式存在,并且具有清除 ROS 的功能<sup>[9-10]</sup>。有研究显示,棉花硫氧还蛋白参与花期调控<sup>[11]</sup>,在黄萎病菌入侵后,棉花体内硫氧还蛋白丰度提高,这表明硫氧还蛋白参与了这一防御过程。此外,在烟草中过表达  $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸合成酶,体内 TRX-h 基因的转录水平显著增强,进而增强了对丁香假胞菌的耐受性<sup>[12]</sup>。

本研究从野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)Columbia(Col-0)中克隆了 TRX-h5 基因,并对其进行了生物信息学分析,为探索该基因的蛋白功能提供了理论依据。同时将 TRX-h5 基因的第 39 位和第 42 位半胱氨酸位点突变(TRX-h5M),探究该位点对 TRX-h5 蛋白活性的影响,为研究 TRXs 蛋白参与调控的 ROS 信号通路提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验材料

野生型拟南芥植株 Col-0、EYFP-TRX-h5-C39S-C42S(TRX-h5M)重组载体、表达载体 pET28a(+),大肠杆菌 DH5 $\alpha$  克隆菌株、大肠杆菌 BL21 表达菌株均由本实验室保存。

#### 1.1.2 实验试剂与仪器

反转录酶、dNTP 聚合物、高保真酶、限制性内切酶(*Xho* I、*Nde* I、*Bam*H I、*Hind* III)、T<sub>4</sub> DNA 连接酶、咪唑(C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>)、His 标签镍柱、质粒提取试剂盒、切胶纯化试剂盒、琼脂粉、酵母提取物、胰蛋白胨、氯化钠、卡纳霉素(工作质量浓度为 50  $\mu$ g/mL)。

本实验所用主要仪器有聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)仪、凝胶成像仪分析系统、电泳仪、高温高压灭菌锅、恒温培养箱、超净工作台、摇床、超声波细胞破碎仪、真空泵、超低温离心机、恒温培养振荡器,紫外分光光度计、冷柜等。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 生物信息学分析

用 ExpASy-ProtParam 工具(<https://web.expasy.org/protparam/>)在线软件对 TRX-h5 基因编码的氨基酸进行基本理化性质的分析;采用 ProtScale 在线工具(<https://web.expasy.org/protscale/>)对 TRX-h5 蛋白进行亲/疏水性分析;采用 PSORT Prediction(<http://psort1.hgc.jp/form.html>)在线软件分析 TRX-h5 蛋白的亚细胞定位;采用 NetPhos3.1Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)在线软件对 TRX-h5 蛋白进行磷酸化位点分析;利用美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)数据库 BLUST 工具(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)分析 TRX-h5 蛋白的保守功能结构域;采用 NPS@: SOPMA secondary structure prediction 和 SWISS-MODEL 预测 TRX-h5 蛋白的二级结构和三级结构。

#### 1.2.2 引物设计与合成

首先从 tair 网站获取 TRX-h5 基因的编码序列(coding sequence, CDS),再使用 Primer5.0 设计引物。上游引物(*Nde* I-FP):5'-GGAATTC CATATGATGGCCGGTGAAGGAGAAG-3'(下

划线部分为 Nde I 酶切位点);下游引物 *Xho* I-RP:5'-CCGCTCGAGTCAAGCAGAAGCTACAAGACCACC-3'(下划线部分为 *Xho*I 酶切位点)。

以 EYFP-TRX-h5M 重组载体为模板的上游引物 (*Bam*H I-FP) 为:AAAAGGATCCATG GCCGGTGAAGGAGAAG;下游引物 (*Hind* III-RP) 为:AAAAAAGCTTTCAAGCAGAAGCTACAAGACCAC。

### 1.2.3 总 RNA 的提取和反转录

采用 Trizol 法提取 RNA,利用反转录-聚合酶链式反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 获得 cDNA,反应体系为:2  $\mu$ L 的 5 $\times$ PrimeScriptRT Mix,2  $\mu$ g 的 Total RNA,RNase Free ddH<sub>2</sub>O 补齐至 10  $\mu$ L。反应条件为:25  $^{\circ}$ C,10 min;42  $^{\circ}$ C,30 min;85  $^{\circ}$ C,5 min;4  $^{\circ}$ C,3 min。

### 1.2.4 TRX-h5 基因的扩增和纯化

以拟南芥 cDNA 为模板,扩增 TRX-h5 基因的 CDS 序列;以 EYFP-TRX-h5M 重组载体为模板扩增 TRX-h5 第 39 位和第 42 位点突变(C 突变为 S)的序列。PCR(5  $\mu$ L)反应体系为:5.0  $\mu$ L 的 10 $\times$ buffer,4.0  $\mu$ L 的 dNTP,2.0  $\mu$ L 的 FP,2.0  $\mu$ L 的 RP,0.6  $\mu$ L 的高保真酶,2.0  $\mu$ L 的 Template DNA,34.4  $\mu$ L 的 ddH<sub>2</sub>O。PCR 反应条件为:94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min;然后进行 30 个 PCR 循环(94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,60  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min);72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 程序结束后,琼脂糖凝胶电泳验证条带大小是否正确,通过切胶纯化的方式回收目的基因。

### 1.2.5 重组载体的构建和转化

将 TRX-h5 的胶回收产物和 PET28a(+ )质粒使用 *Xho* I /*Nde* I 双酶切;TRX-h5M 胶回收和 PET28a(+ )使用 *Bam*H I /*Hind* III 双酶切。酶切后胶回收目的基因及线性化载体。连接反应 16  $^{\circ}$ C 过夜。连接体系为:5 $\times$ buffer 和基因片段各 2  $\mu$ L,T4 DNA 连接酶和 ddH<sub>2</sub>O 各 1  $\mu$ L,pET28a(+ )线性化载体 4  $\mu$ L。

将连接后的产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,用卡纳霉素琼脂平板筛选阳性克隆过夜培养。挑选阳性克隆进行 PCR 和双酶切鉴定,鉴定为阳性的重组质粒,送至生工生物工程股份有限公司进行测序,测序正确后,将重组载体命名为 pET28a(+ )TRX-h5、pET28a(+ )TRX-h5M,将重组载体转化 BL21 感受态细胞。

### 1.2.6 目的蛋白的诱导表达及纯化

将转化大肠杆菌 BL21 的阳性单菌落先小摇后大摇,在 220 r/min、37  $^{\circ}$ C 的条件下摇至 A<sub>600</sub> 为 0.6,加入诱导剂 IPTG(终浓度 0.2 mmol/L),22  $^{\circ}$ C 的条件下诱导 16~24 h。

诱导后的菌液 4  $^{\circ}$ C,6 000 r/min 离心 20 min 去上清。沉淀用 solution1 (0.3 mol/L NaCl,20 mmol/L Tris-HCl,pH 值 7.6)按照每升诱导液加入 30 mL 的比例重悬,破细胞 30 min,再用高速离心机 4  $^{\circ}$ C,12 000 r/min 离心 30 min 取上清置冰上备用。

分别用 solution1、solution2 (20 mmol/L Tris-HCl,0.3 mol/L NaCl,50 mmol/L 咪唑,pH 值 7.6)洗脱杂蛋白,然后用 solution3 (20 mmol/L Tris-HCl,0.3 mol/L NaCl,0.3 mol/L 咪唑,pH 值 7.6)洗脱目的蛋白。并利用透析袋除去咪唑,将蛋白保存在 -80  $^{\circ}$ C 备用。

### 1.2.7 目的蛋白质质量浓度和酶活的检测

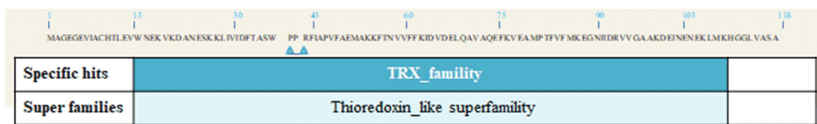
以牛血清蛋白为标准蛋白制作标准曲线,将目的蛋白稀释合适的倍数后使用紫外分光光度计在 595 nm 波长下测吸光度值,计算蛋白质质量浓度。TRX-h 酶活测定反应体系包含 100 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 值 7.0)、2 mmol/L EDTA 和 130  $\mu$ mol/L 牛胰岛素(含或不含 2  $\mu$ mol/L TRX-h5)。通过添加 0.33 mmol/L DTT 启动酶促反应。在 650 nm 处监测 TRX-h5 引起的浊度。

## 2 结果与分析

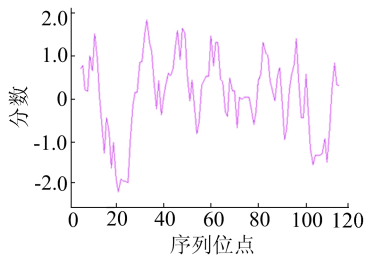
### 2.1 TRX-h5 基因的基本理化性质分析

TRX-h5 基因编码一条含 118 个氨基酸的肽链,分子式为 C<sub>594</sub>H<sub>933</sub>N<sub>149</sub>O<sub>169</sub>S<sub>8</sub>,相对分子质量为 13 122.32,理论等电点为 5.19,脂溶性指数为 89.24。该蛋白的不稳定参数为 26.74,属于稳定性蛋白(小于 40 为稳定蛋白)。在氨基酸残基的组成上,丙氨酸(Ala)和缬氨酸(Val)数目最多,各占 11.9%。

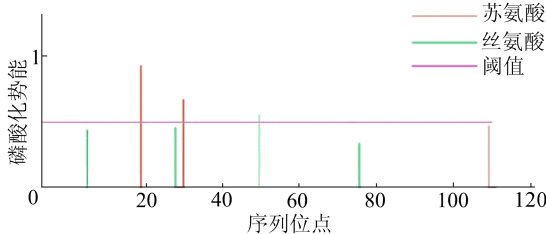
使用 NCBI Conserved Domain 软件对 TRX-h5 蛋白进行保守结构域分析,结果如图 1a 所示。由图 1a 可知,该蛋白属于 TRX 家族。采用 ExPASy-ProtScale 对亲疏水性进行分析,结果如图 1b 所示。由图 1b 可知,TRX-h5 蛋白为亲水性蛋白。对 TRX-h5 蛋白进行磷酸化位点预测分析,结果如图 1c 所示。由图 1c 可知,该蛋白含有 3 个磷酸化位点,分别是 2 个丝氨酸(Ser)、1 个苏氨酸(Thr)。



(a) TRX-h5蛋白保守结构域预测



(b) TRX-h5蛋白亲水性/疏水性预测



(c) TRX-h5蛋白磷酸化位点预测

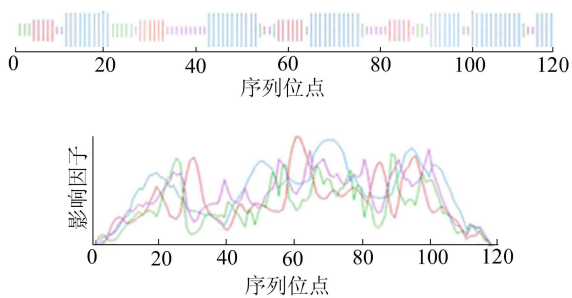
图 1 TRX-h5 蛋白一级结构理化性质分析

2.2 二级结构和三级结构预测

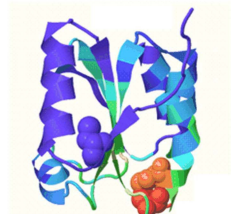
TRX-h5 蛋白的二级结构运用 SOPMA 在线软件进行分析,如图 2a 所示。

从图 2a 可以看出,该蛋白的二级结构包括  $\alpha$ -螺旋(45.76%)、无规则卷曲(22.88%)、伸展链(19.49%)和  $\beta$ 折叠(11.86%), $\alpha$ -螺旋和无规则卷曲为该蛋白二级结构的主要元件。

运用 SWISS-MODEL 建模软件对 TRX-h5 蛋白三级结构预测分析,模型是以同源建模的方式模拟,是在二级结构基础上盘绕、折叠产生的特定空间结构,如图 2b 所示。



(a) TRX-h5蛋白二级结构预测



(b) TRX-h5蛋白三级结构预测

图 2 TRX-h5 蛋白结构分析

2.3 TRX-h5 的 PCR 扩增

以拟南芥野生型 CDS 为模板,以 TRX-h5-F 和 TRX-h5 为引物进行扩增,核酸琼脂糖电泳检测结果如图 3 所示,扩增产物有一条特异性条带,

与拟南芥 TRX-h5 基因的大小相符(TRX-h5 大小为 357 bp)。

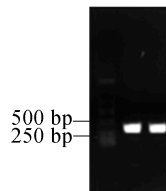


图 3 PCR 扩增 TRX-h5 基因片段琼脂糖电泳图

2.4 PET28a(+)-TRX-h5 载体的构建

提取阳性菌落质粒进行测序,结果显示质粒中连接的目的基因与 TRX-h5 基因片段完全相符,未发生任何突变,将送去测序的菌落进行扩播,提取质粒并转入表达菌株 BL21,挑取单克隆进行菌落鉴定。

本文利用 Primer 5 软件在 PET28a(+)载体上设计引物 pET28a(+)-F(TAGTTATTGCT-CAGCGGTGG) 和 pET28a(+)-R(TCAT-GAGCGCTTGTTCGGC),利用 PCR 扩增,确认 TRX-h5 基因片段与载体是否成功连接。条带在 250~500 bp 中间的位置,与实际大小 357 bp 相符,选取含目的基因的单克隆作为诱导菌种,如图 4 所示。

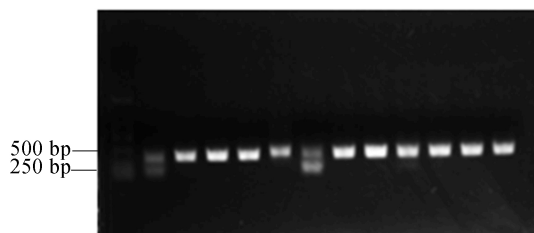


图 4 菌落 pET28a(+)-TRX-h5/BL21 PCR 电泳图

### 2.5 TRX-h5 蛋白的诱导及纯化

在 22 °C 条件下,终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG 诱导 12~16 h, SDS-PAGE 电泳检测诱导的蛋白表达情况。诱导表达后的 BL21 菌体通过超声波细胞破碎仪得到表达后的蛋白,经镍柱后,带有 His 标签的 TRX-h5 蛋白和 TRX-h5M 蛋白得以纯化,如图 5 所示。

图 5 中:M 代表 Marker;泳道 1 代表诱导前蛋白表达情况;泳道 2 代表诱导后蛋白表达情况;泳道 3 代表样品洗脱液;泳道 4 和泳道 5 代表杂蛋白的洗脱;泳道 6 和泳道 7 代表目的蛋白的洗脱。

由图 5 可知,在接近 14 kDa (TRX-h5 分子量为 13.1 kDa, 6 个组氨酸分子量为 0.9 kDa) 处出现单一的条带,符合 TRX-h5 蛋白分子量大小。

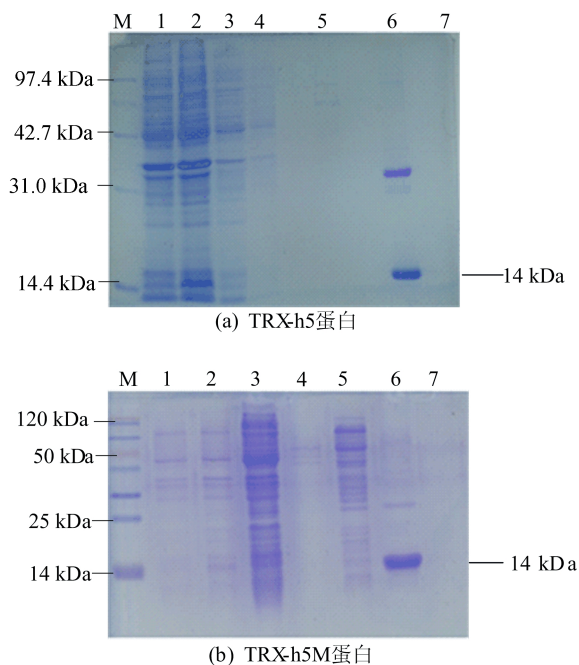


图 5 蛋白 SDS-PAGE 电泳图

### 2.6 TRX-h5 蛋白的质量浓度及酶活检测结果

以牛血清蛋白为标准蛋白制作标准曲线,如图 6 所示。

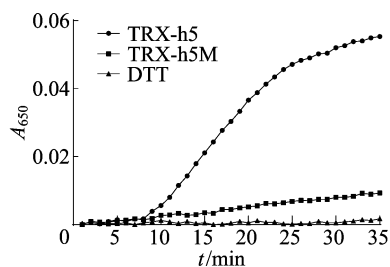


图 6 TRX-h5、TRX-h5M 蛋白的酶活测定

根据此标准曲线算出表达的 TRX-h5 蛋白质量浓度为 0.4  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; TRX-h5M 蛋白质量浓度为 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。TRX-h5 蛋白的 2 个半胱氨酸位点突变后,酶活力显著降低。

## 3 讨 论

在生长发育过程中,胁迫因子会使植物体内氧化还原状态失去平衡,造成氧化胁迫。植物会演化出多种调节途径和调节方式来对体内氧化还原状态进行调节,以避免氧化性伤害的产生,其中主要的调节方式包括:活性氧的酶促清除和非酶促清除;与谷胱甘肽相关的氧化还原调节等方式。

拟南芥硫氧还蛋白是由 118 个氨基酸组成的小分子蛋白。对 TRX-h5 蛋白进行磷酸化位点预测分析,结果表明该蛋白含有 3 个磷酸化位点,分别是 2 个丝氨酸(Ser)、1 个苏氨酸(Thr)。TRX-h5 是否参与了拟南芥氧化平衡的调节,这些磷酸化位点是否为 TRX-h5 蛋白的修饰位点,需要进一步探究。TRX-h5 蛋白属于稳定性蛋白,其二级结构元件包括  $\alpha$ -螺旋(45.76%)、无规则卷曲(22.88%)、伸展链(19.49%)和  $\beta$  折叠(11.86%), $\alpha$ -螺旋和无规则卷曲为该蛋白二级结构的主要元件。

运用 SWISS-MODEL 建模软件对 TRX-h5 蛋白三级结构预测分析,该蛋白有 3 个半胱氨酸位点,其中第 39 位和第 42 位半胱氨酸裸露在蛋白质表面,将这 2 个半胱氨酸位点突变后,运用原核表达系统体外表达 TRX-h5M 蛋白和 TRX-h5,并测定 2 个蛋白的酶活力,分析发现 TRX-h5 的第 39 位和第 42 位半胱氨酸位点决定了该蛋白的催化活性。这意味着第 39 位和第 42 位这 2 个位点的半胱氨酸可能是调节拟南芥 TRX-h5 蛋白活力的关键位点。

植物在受到氧化胁迫后,信号分子引发防御信号,硫氧还蛋白作为参与调节氧化还原平衡的关键蛋白,其第 39 位和第 42 位半胱氨酸可能是信号分子的作用位点,从而促发下游防御信号。这种调节方式需要进一步证明。

本文对 TRX-h5 蛋白进行结构上的预测,对研究其功能提供了理论依据。同时建立了体外表达 TRX-h5 的方法,探究了其第 39 位和第 42 位半胱氨酸对 TRX-h5 酶活力的影响。为 TRX-h5 的功能调节机制及植物氧化还原系统的研究提供了新思路。

## [参 考 文 献]

- [1] KABBAGE M, KESSENS R, BARTHOLOMAY L C, et al. The life and death of a plant cell[J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2017, 68:375-404.
- [2] FOYER C H, NOCTOR G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts peroxisomes and mitochondria[J]. *Physiol Plantarum*, 2003, 119(3):355-364.
- [3] APEL K, HIRT H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, 55:373-399.
- [4] MLLER A P, MOUSSEAU T A, DE LOPE F, et al. Elevated frequency of abnormalities in barn swallows from chernobyl[J]. *Biol Lett*, 2007, 3(4):414-417.
- [5] TAKAHASHI H, YAMAUCHI T, COLMER T D, et al. Aerenchyma formation in plants[J]. *Low-Oxygen Stress in Plants*, 2014, 21:247-265.
- [6] 吴顺, 萧浪涛. 植物体内活性氧代谢及其信号转导[J]. *湖南农业大学学报*, 2003, 29(5):450-455.
- [7] ZHANG C J, ZHAO B C, GE W N, et al. An apoplastic h-type thioredoxin is involved in the stress response through regulation of the apoplastic reactive oxygen species in rice [J]. *Plant Physiol*, 2011, 157(4):1884-1899.
- [8] REICHHELD J P, MESTRES-ORTEGA D, LALOI C, et al. The multigenic family of thioredoxin *h* in *Arabidopsis thaliana*: specific expression and stress response[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2002, 40(6/7/8):685-690.
- [9] COLLIN V, ISSAKIDIS-BOURGUET E, MARCHAND C, et al. The *Arabidopsis* plastidial thioredoxins: new functions and new insights into specificity [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(26):23747-23752.
- [10] KÖNIG J, BAIER M, HORLING F, et al. The plant-specific function of 2-Cys peroxiredoxin-mediated detoxification of peroxides in the redox-hierarchy of photosynthetic electron flux[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(8):5738-5743.
- [11] 李云飞, 桑娜, 刘慧, 等. 棉花硫氧还蛋白基因 *Gh-WCRKC2-5* 参与开花调控的功能研究[J]. *石河子大学学报(自然科学版)*, 2018, 36(6):774-782.
- [12] GHANTA S, BHATTACHARYYA D, SINHA R, et al. *Nicotiana tabacum* overexpressing  $\gamma$ -ECS exhibits biotic stress tolerance likely through NPR1-dependent salicylic acid-mediated pathway[J]. *Planta*, 2011, 233(5):895-910.

(责任编辑 闫杏丽)

## (上接第 391 页)

- [12] 刘圣保, 张公让, 李巧巧, 等. 非等间距 GM(1,1) 模型背景值的改进及其最优化[J]. *合肥工业大学学报(自然科学版)*, 2010, 33(11):1749-1752.
- [13] CAIY H, ZENG W J. Improvement and application of initial value of non-equidistant new information GM(1,1) model[J]. *Applied Mechanics and Materials*, 2012, 27(7):198-199.
- [14] 高宁, 高彩云. 利用非齐次指数函数构造 GM(1,1) 模型背景值的新方法[J]. *统计与决策*, 2017(17):24-27.
- [15] 卢捷, 李峰. 基于初始值和背景值改进的 GM(1,1) 模型优化与应用[J]. *运筹与管理*, 2020, 29(9):27-33.
- [16] 党耀国, 刘思峰, 刘斌, 等. 关于弱化缓冲算子的研究[J]. *中国管理科学*, 2004(2):109-112.
- [17] 李凯. 灰色预测模型的优化及其应用研究[D]. 上海: 上海财经大学, 2020.
- [18] REN X W, TANG Y Q, LI J, et al. A prediction method using grey model for cumulative plastic deformation under cyclic loads[J]. *Natural Hazards*, 2012, 64(1):441-457.
- [19] 潘翱翔, 赖健琼. 基于改进灰色预测模型的道路交通事故预测模型研究[J]. *计算机时代*, 2022(5):33-38.
- [20] 彭振斌, 张闯, 彭文祥, 等. GM(1,1) 模型背景值构造的不同方法与应用[J]. *东北大学学报(自然科学版)*, 2017, 38(6):869-873.
- [21] 孙永荣, 胡应东, 陈武, 等. 基于 GM(1,1) 改进模型的建筑物沉降预测[J]. *南京航空航天大学学报*, 2009, 41(1):107-110.
- [22] 黄学林, 王观虎, 龙小勇, 等. 机场道面预防性养护评价指标综合改进灰色预测模型[J]. *铁道科学与工程学报*, 2021, 18(12):3228-3238.
- [23] 刘思峰, 党耀国, 方志耕, 等. 灰色系统理论及其应用[M]. 北京: 科学出版社, 2017.
- [24] 袁旦, 刘献, 张小丽. 基于改进灰色模型 GM(1,1) 的生活用水量预测研究[J]. *陕西水利*, 2020(7):1-3, 16.

(责任编辑 张 镗)