

棉纤维特异表达蓝铜蛋白基因 (*GhBCP1*) 的克隆与鉴定

田 琴¹, 李艳军¹, 郭 芳¹, 张新宇¹, 王海云², 孙 杰¹

(¹石河子大学农学院/新疆兵团绿洲生态农业重点实验室, 新疆石河子 832003; ²中国科学院微生物研究所, 北京 100101)

摘要: 【目的】对从棉纤维细胞分离获得的基因 *GhBCP1* 进行序列和表达分析, 初步分析其功能。【方法】采用 mRNA 荧光差异显示结合 cDNA 末端快速扩增技术克隆基因全长 cDNA 序列, 用生物信息学方法对获得的 cDNA 序列及推定氨基酸序列进行分析, 并用荧光实时定量 PCR 法研究基因在不同组织中的表达。【结果】克隆了一个棉纤维特异表达基因的全长 cDNA, 命名为 *GhBCP1* (GenBank 登录号: EF222282), 该 cDNA 全长 721 bp, 含有一个编码 176 个氨基酸蛋白的开放阅读框。BLAST 分析表明该基因所编码产物为一个蓝铜蛋白。Southern 杂交分析表明该基因在陆地棉 (*Gossypium hirsutum* L.) 中有 2 个拷贝。实时荧光定量 PCR 分析发现该基因在棉花纤维细胞特异表达, 在纤维发育过程中, *GhBCP1* 转录产物的累积主要发生在纤维细胞发育由伸长向次生壁合成转换阶段。【结论】*GhBCP1* 基因的组织特异性和发育阶段性表达初步证明该基因的功能可能与次生壁合成的起始密切相关。

关键词: 棉花; 纤维; 蓝铜蛋白; 特异表达

Isolation and Characterization of a Blue Copper Protein Gene (*GhBCP1*) Associated with Cotton Fiber Development

TIAN Qin¹, LI Yan-jun¹, GUO Fang¹, ZHANG Xin-yu¹, WANG Hai-yun², SUN Jie¹

(¹College of Agriculture, Shihezi University/The Key Oasis Eco-Agriculture Laboratory of Xinjiang Production and Construction Group, Shihezi 832003, Xinjiang; ²Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

Abstract: 【Objective】The aim of this study was to isolate the cDNA sequence of the gene *GhBCP1*, and to probe the functions of the gene by characterizing its expression patterns in different tissues and developing fibers. 【Method】The full-length cDNA sequence of *GhBCP1* was cloned by Fluorescence differential display (FDD) technique and rapid amplification of the cDNA ends (RACE). Bioinformatics methods were used to analyze the cDNA and the encoded amino acid sequence, and fluorescence real time quantitative PCR method was used to study the expression pattern of the gene in different tissues. 【Result】A full-length cDNA that is specifically expressed in cotton fiber cells was cloned. The gene was designated *GhBCP1* (GeneBank accession: EF222282). The cloned cDNA was 721bp in length which encoded a peptide of 176 amino acids. Blast analysis indicated that this gene encoded a blue copper protein. Southern blot analysis showed that the upland cotton genome contains two copies of the gene. Real-time PCR analysis indicated that *GhBCP1* was specifically expressed in fiber cells and its transcripts were more abundant at the transition between the elongation and secondary cell wall synthesis stages. 【Conclusion】The results showed that *GhBCP1* may play a role at the onset of the secondary cell wall synthesis in developing cotton fiber cells.

Key words: *Gossypium hirsutum* L.; cotton fiber; blue copper protein; specific expression

0 引言

【研究意义】棉花是世界上首要的纤维作物和重要的油料作物。棉纤维是由棉花胚珠外珠被表皮层的

单细胞发育而成,其分化和发育过程可分为纤维起始、初生细胞壁形成(或纤维细胞的伸长)、次生细胞壁的加厚和脱水成熟等 4 个时期^[1]。在纤维发育过程中形成纤维长度、细度和强度等重要品质性状。毫无疑

收稿日期: 2009-04-06; 接受日期: 2009-09-29

基金项目: 国家“973”计划项目(2004CB117304)

作者简介: 田 琴, 硕士。E-mail: shz-tianqin@163.com。通信作者孙 杰, 教授, 博士。Tel: 0993-2057961; E-mail: sunjie@shzu.edu.cn

问, 棉纤维的发育和品质形成是由基因控制的, 因此分离和克隆棉纤维发育和调控基因是研究棉纤维发育机制的基础。【前人研究进展】自 1992 年 John 等^[2]分离到第一个棉纤维优势表达基因 *E6* 以来, 已经有数十个棉花纤维优势或特异表达及纤维发育调控基因被克隆^[3-10], 但是对这些基因在调控纤维发育的作用方面的研究很少。据估计, 棉花纤维发育过程中有上千个特异基因的表达, 目前被分离鉴定的基因还是少数。蓝铜蛋白是一类广泛存在于细菌、植物和动物中的小分子含铜蛋白, 一直以来被认为与生物体内电子传递和氧化还原有关^[11-12], 但是这类蛋白在植物中的功能并不明确。【本研究切入点】本研究利用 mRNA 荧光差异显示 (FDD) 技术分离棉纤维不同发育阶段差异表达基因, 获得了 20 个在棉纤维发育不同阶段优势或特异表达基因, 序列比较发现其中 16 个是在棉花中首次被克隆^[13]。【拟解决的关键问题】本文对其中一个编码蓝铜蛋白 (blue copper protein) 基因 *GhBCP1* 的序列和表达特征进行研究, 为进一步研究其在棉纤维发育中的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 棉花品种为陆地棉 (*Gossypium hirsutum* L.) 品种 TM-1, 由中国农业科学院棉花研究所资源室提供。2005 年播种于石河子大学农学院试验田中, 进行常规农事作业和田间管理。在棉花开花当天挂牌标记棉铃, 按 3、6、9、12、15、18、21、24、27、30 DPA (开化后天数) 采集棉铃, 发育 3 DPA 棉铃直接剥取胚珠, 其它样品剥取子棉, 并用镊子从胚珠上剥取纤维细胞, 液氮中速冻后保存于 -80°C 冰箱。

TM-1 种子经硫酸脱绒, 0.1% 氯化汞灭菌 10 min, 去除种壳后播种于 MS 培养基中, 在 $28-30^{\circ}\text{C}$ 光照培养箱中培养 2 周, 分别取根、下胚轴和叶, 花直接从田间植株上采集, 上述材料在液氮中速冻后, 保存于 -80°C 冰箱, 用作 RNA 和 DNA 的提取。

1.1.2 菌种、质粒及试剂 *Escherichia coli* 菌株 Top10 为新疆兵团绿洲生态农业重点实验室保存。T4 连接酶和 FDD 试剂盒购自 Beckman 公司; RACE 试剂盒采用 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit; pGEM-T easy vector 和 Radom Primer DNA Labeling Kit 购于 Promega; 尼龙膜 Hybond-N⁺ 购于 Amersham 公司; Superscript III RT 逆转录酶为 Invitrogen 公司产

品; PCR 酶购于 TaKaRa 公司; 放射性同位素 ³²P-dCTP 购于亚辉公司; 各种限制性内切酶购于 MBI 公司; 异硫氰酸胍、CsCl 为 AMRESCO 公司产品, 其它试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 棉花 DNA 和 RNA 的提取 取 1 g 棉花叶片, 液氮研磨后用植物 DNA 抽提试剂盒 (Amersham) 提取基因组 DNA。

棉花组织 RNA 的提取采用氯化铯/异硫氰酸胍超速离心法^[14]。

1.2.2 荧光差异显示 按孙杰等^[14]介绍的方法进行。

1.2.3 cDNA 末端序列的快速扩增 (5'-RACE) 合成 2 条 *GhBCP1* 特异反向引物, sp1: 5'-CAC AAT GAC CAG CCA CAC CA-3'; sp2: 5'-TGC CCA GCC AGA GGC GTC CA-3', 按照 RACE 试剂盒说明进行操作。扩增片段从琼脂糖回收后连接到 T-载体上, 酶切鉴定后测序。

1.2.4 荧光定量 PCR

1.2.4.1 引物设计和标准曲线的建立 在 *GhBCP1* 基因的序列中跨 3'-UTR 设计引物, RT1: 5'-CGG CGG TAC TCA CTA CTT-3', RT2: 5'-AGC ACT GCC TCT ATC CTG-3', 目的片段 289 bp。用 *Ubiquitin* (Ubi) 做内标, 引物是 Ubi-up: 5'-CAG ATC TTC GTC AAA ACC CT-3' 和 Ubi-dn: 5'-GAC TCC TTC TGG ATG TTG TA-3', 目的片段 200 bp。将含 *GhBCP1* cDNA 的质粒和含引物 Ubi-up 和 Ubi-dn PCR 扩增产物的质粒分别用作 *GhBCP1* 和内标基因的标准品, 再将标准品分别进行 10 倍梯度稀释, 稀释 6 个梯度, 作为模版进行实时定量荧光 PCR 检测, 每个梯度 2 次重复。最后根据 CT 值以及稀释梯度建立标准曲线。

1.2.4.2 荧光定量 PCR 体系和数据处理 25 μL 荧光定量 PCR 体系含 $2\times$ PCR buffer 10 μL , $20\times$ EvaGreen 染料 0.6 μL , 上下游引物 ($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 各 0.4 μL , Hot Start Taq 酶 0.2 μL , 模版 2 μL , 灭菌双蒸水 11.4 μL 。利用 SmartCycler II 荧光定量 PCR 仪进行扩增, 反应程序为 95°C 120 s; 95°C 15 s; 55°C 30 s; 72°C 30 s, 45 个循环, 55°C 读取荧光值; 循环结束后进行溶解曲线分析。

检测每份样品的 *GhBCP1* 和 *Ubiquitin* CT 值, 每份样品 3 次 PCR 重复, 取其平均值, 根据标准曲线计算定量结果及校正值, 再计算每个组织校正值的平均值和标准差。使用 Microsoft Excel 软件处理数据。

1.2.5 Southern 杂交 20 μg 棉花基因组 DNA 用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 2 种限制性内切酶完全酶切后, 1% 琼脂糖凝胶电泳, 转移到尼龙膜 (HyBond-N⁺, Amersham) 上, 65 $^{\circ}\text{C}$ 预杂交 2 h 后, 利用 Primer- α -gene Labeling System (Promega) 标记试剂盒, 对 *GhBCP1* 的全长 cDNA 进行标记, 用作 Southern 杂交探针, Church 缓冲液杂交 16 h 后洗膜, 压片。

1.2.6 DNA 序列测定与分析 DNA 序列由自动测序仪测序, 同源性比较在 NCBI BLAST 上进行, ORF 及蛋白保守区分析通过 DNAMAN 和 Motifscan 等软件完成。

2 结果

2.1 *GhBCP1* 全长 cDNA 的克隆和序列分析

以 9、21 和 27 DPA 的棉纤维为材料, 利用荧光差异显示技术从中分离克隆了 1 个与蓝铜蛋白基因同

源的 cDNA 片段, 通过 5'-RACE 获得 5'端序列, 拼接得到全长为 721 bp 的 cDNA 序列, 命名为 *GhBCP1* (GenBank 登录号: EF222282)。利用 DNAStar 软件包的 EditSeq 程序分析克隆基因的序列, 寻找到最长的开放阅读框 (openreading frame, ORF) 为 528 bp, 编码含 176 个氨基酸 (图 1), 将 ORF 转换成氨基酸序列, 其中包括 11 个碱性氨基酸, 12 个酸性氨基酸, 75 个极性氨基酸, 73 个疏水性氨基酸。同时在 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 对核苷酸序列进行 BLASTx 分析, 以确定 ORF 是否正确。用 Espasy pI/Mw 程序对其氨基酸序列进行了一级结构的预测, 其理论等电点 pI=5.11, 分子量 Mw=17.99 kD。

根据 NCBI CDS (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/cdd>) 分析发现该基因的氨基酸序列在 35—115 处是 1 个质体蓝素类 (plantacyanin) 的保守区域。

```

1  GATCACAAAATTCTCCTCACTCTCATTTCAAAGTGTTCCTCCACCTAGTCTCTTCCACAA
61  GAAAATGGCAAGCTCAAGTGTGGGAATGGCCTGTCTTGGGCTAGTTTTATGCATGGTGGT
21      M A S S S V G M A C L G L V L C M V V
121  TGTGCCAAGCTTGGCCACGGTTTACAATGTTGGTGACGCCCTGGCTGGGCAACCGGTGT
41  V P S L A T V Y N V G D A S G W A T G V
181  CGATTTTAGTAGTTGGGCTAGCGACAAGACCTTCAAAGTTGGAGATCCCTCGTTTTCAA
61  D F S S W A S D K T F K V G D S L V F N
241  TTACCCAACAAGCCATACGGTGGAGGAGTAAGTTCTAGCGATTACAGTGCATGTACGGT
81  Y P T S H T V E E V S S S D Y S A C T V
301  GGGAAAGCAATCTCGACGGATAGCACCAGCCACCACCATCAATCTGAAGACCGGGCGG
101  G K A I S T D S T G A T T I N L K T G G
361  TACTCACTACTTCATTTGTGGTGTGGCTGGTCATTGTGAGAACGGCATGAAGCTTGCGGT
121  T H Y F I C G V A G H C E N G M K L A V
421  CAAAGTGGAGTCTTCTTCTTCTTCACTTCCACTGATAAACCATCAACCACTTCCACCATC
141  K V E S S S S S S S T D K P S T T S P S
481  TACTACTACGACGACTAAGATCCCGGATTCATCTTCTTATGGAGTCTTTCACCGTTCT
161  T T T T T K I P D S S S W S L S P V L
541  GGCTTTTGTACAACCTGGGTCGCATTGTGCGTGATGATGGTTGTTTCATAAGCTTTTGG
181  A F V T T W V A L C V M M V V S *
601  TGGCTAAAATGGTGGTTGGCTTGGCCAGGATAGAGGCAGTGCTTTGTTTGTATTGAGGAT
661  TATTGCTTTTATTTTATGAATGAGAACCTTACTTGTCTGTTTCAAAAAAAAAAAAAA
721  A

```

*表示终止密码子的位置 * indicating the position of termination codon

图 1 *GhBCP1* 的全长 cDNA 序列及推定的氨基酸序列

Fig. 1 The full length cDNA sequence of *GhBCP1* and its deduced amino acid sequence

2.2 *GhBCP1* 与已克隆的蓝铜蛋白的同源性比较

为进一步鉴定克隆序列, 利用 ClustalX 程序将 *GhBCP1* 与其它植物已经报道的 7 个蓝铜蛋白进行氨基酸的多重序列比较。如图 2 所示, *GhBCP1* 和其它 7 个已知的蓝铜蛋白的结构一致, 含有与 Cu 离子结合的 4 个保守氨基酸残基: 1 个半胱氨酸 (Cys)、1 个

蛋氨酸 (Met) 和 2 个组氨酸 (His)。

2.3 *GhBCP1* 的 Southern 杂交分析

为了明确 *GhBCP1* 在棉花基因组中的分布, 将 TM-1 的基因组 DNA 用该 cDNA 序列内部所不含有的 2 种限制性内切酶完全酶切, 转膜后与 *GhBCP1* 全长 cDNA 标记探针杂交, 放射自显影结果显示所有泳道

Q41001	VGDTSGWVIGG-DYSTWASDKTFAVGDSLVEFNYGAGAH	TVDEVKES	73
NM_105882.2	V----EWSLGLK-DYSSLATGKSAFVGDTIVFNRYGA-G	HTVDEVSES	68
EU974428.1	VGDASGWTTTG-DYATWASGKKFKVGDSELEFKYAGGAH	TVDEVSA	74
EU962639.1	VGDSQGWTTTGVDYSSWASRNTFVVGDTLVEFNYSKAH	TVTEVSKA	64
AJ307662.1	VGDTSGWSSGV-DYVTWAKSKTFSVGDSELVFQYSM-M	HTVAEVSSA	73
AY350710.1	VGDTSGWDISS-DLESWTLGKRFSVGDVLMFQY-SST	HSVYEVAKD	74
2CBP_A	VGGSGGWTFNT---ESWPKGKRFRAGDILLFNYP	SMINVVVNQG	48
<i>GhBCP1</i>	VGDASGWATGV-DFSSWASDKTFKVGDSLVEFNYP	SHTVEEVSSS	72
Q41001	DYKSCTSGNSISTDSTGATTIPLKKAGKHYFI	CGVPGHSTGGMKLS	119
NM_105882.2	DYKSCTLGNAISSDSSGTTSIALKTPGPHYFI	CGIPGHCCTGGMKLS	114
EU974428.1	DYAACSSSNALSTDSAGATTVTLKTAGKHYFI	CGVAGHCSSGMKLA	120
EU962639.1	GYDACSGANALSDDDTGSTTITLQTPGTHYFI	CNVPGHCASGMKLA	119
AJ307662.1	DYSACSASNSIQSYSDQNTKIALTKPGTRYFI	CGTSGHCSSGMKLA	119
AY350710.1	NFQSCNSTDPIRTFTNGNTTVALSKPGDGF	FLCGNRLHCFAGMRLQ	120
2CBP_A	GFSTCNTPAGAKVYTSGRDQIKLPK-GQSYFI	CNFPGHCCQSGMKIA	92
<i>GhBCP1</i>	DYSACTVGKAISTDSTGATTINLKTGGTHYFI	CGVAGHCENGMKLA	118

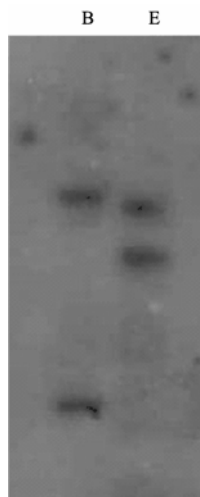
Q41001: 豌豆蓝铜蛋白; NM_105882.2: 拟南芥蓝铜蛋白; EU974428、EU962639: 玉米蓝铜蛋白; AJ307662: 稻蓝铜蛋白; AY350710: 甘蓝蓝铜蛋白; 2CBP_A: 黄瓜蓝铜蛋白; *GhBCP1*: 棉花蓝铜蛋白。阴影部分表示与铜离子结合的氨基酸残基

Q41001: Blue copper protein in pea; NM_105882: Blue copper protein in *Arabidopsis*; EU974428、EU962639: Blue copper protein in *Zea mays*; AJ307662: Blue copper protein in rice; AY350710: Blue copper protein in *Brassica oleracea*; 2CBP_A: Blue copper protein in cucumber; *GhBCP1*: Blue copper protein in cotton. Amino acids involved in copper binding are shaded

图 2 棉花 *GhBCP1* 蛋白与其它同源蛋白的多重序列比对

Fig. 2 The multiple sequence alignment of *GhBCP1* and homologous proteins

都有 2 条杂交带 (图 3), 表明棉花基因组中含有该基因的 2 个拷贝。



B: 用 *BamH* I 酶切; E: 用 *EcoR* I 酶切
B: Digested by *BamH* I; E: Digested by *EcoR* I

图 3 棉花基因组中 *GhBCP1* 拷贝数 Southern blotting 分析

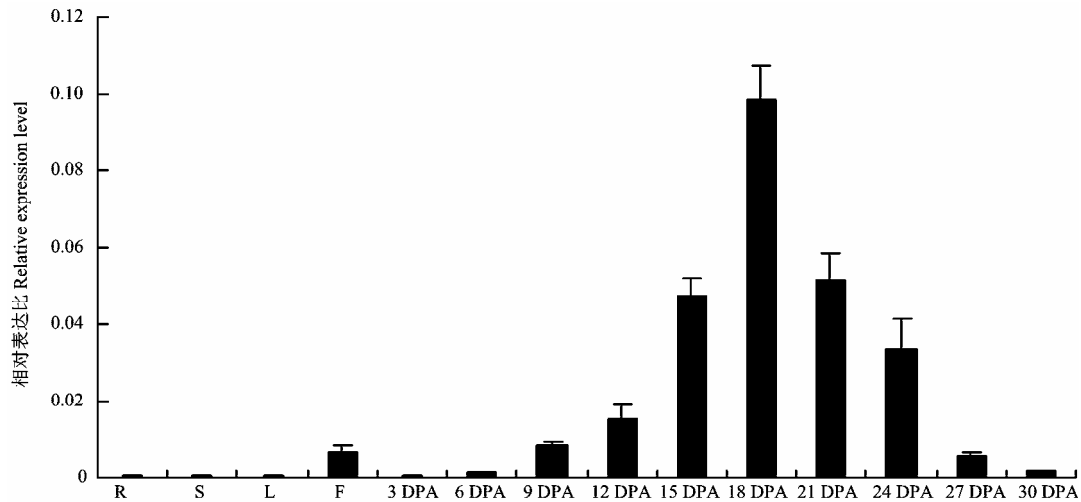
Fig. 3 The southern-blotting analysis of *GhBCP1* gene copy number in *Gossypium hirsutum* L. genomic DNA

2.4 *GhBCP1* 在棉花不同器官的表达特征分析

为研究 *GhBCP1* 在棉花中表达的时空特性, 对不同器官 (组织) 来源的 RNA 做了实时荧光定量 PCR 分析。结果发现, *GhBCP1* 主要在纤维中表达, 在花中有表达但表达量很低, 在根、茎、叶中几乎不表达。其转录本在不同时期的纤维中的含量变化较大, 花后随着纤维的发育, 表达量逐渐增大, 在 18 DPA 的纤维中表达量最高, 然后随着纤维发育表达量逐渐下降 (图 4)。纤维发育的 18 DPA 恰好是初生壁向次生壁转换时期, 因此笔者推测 *GhBCP1* 可能与次生壁合成的起始相关。

3 讨论

铜元素是生物体的必需元素, 有许多重要的蛋白质通过与铜离子结合来行使它们的功能^[15]。蓝铜蛋白 (类型 I) 是一类含单个 Cu^{2+} 结合域的蛋白, 因在 600 nm 有一个最大吸收峰显蓝色或蓝绿色而得名^[16], 通常含有 4 个保守的与铜结合的配体氨基酸: 2 个 His、1 个 Cys 和 1 个 Met^[17-18]。前 3 个配体是蓝铜结合位点所必须的, 它们与铜离子形成稳定的三角结构, 第 4 个配体 Met 可以被其它的氨基酸取代, 如 Leu 或 Phe^[15]。



R: 根; S: 幼茎; L: 嫩叶; F: 花; F—DPA: 开花后 3 (包括胚珠)、6、9、12、15、18、21、24、27、30 DPA 纤维
R: Root; S: Young stem; L: Young leaf; F: Flower; F-DPA: The fiber of 3 (including ovules), 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30 DPA (days after anthesis)

图 4 *GhBCP1* 在不同组织和不同发育时期纤维里的表达水平的相对比率

Fig. 4 The expression level of *GhBCP1* gene in various tissues of cotton plant and in different developmental stages of cotton fiber

近几十年来,人们对蓝铜蛋白的晶体结构、光化学特性和电化学方面作了较详尽的研究,一般认为蓝铜蛋白作为电子载体参与电子传递,从这种蛋白生物化学和生物物理特性推测它们与生物体氧化还原反应有关,但是这类蛋白确切生物功能还不是很清楚。Kim等^[19]从百合柱头中分离了一个蓝铜蛋白,研究发现该蛋白诱导花粉管向化性,这也是第一个功能明确的蓝铜蛋白。Sedbrook等^[20]发现拟南芥蓝铜蛋白基因 *SKU5* 与根的定向生长有关。Dong等^[21]研究发现一种蓝铜蛋白在拟南芥的繁殖中起重要作用。Drew等^[22]从豌豆中分离了一个蓝铜基因,研究发现这个基因的产物与木质素 (lignin) 的沉积相关。Bao等^[23]研究发现蓝铜蛋白家族中的漆酶存在于木质部,与细胞壁有关,能够氧化木质素单体,进一步研究发现,漆酶是在一些辅助蛋白的协助下参与木质素的合成^[24-25]。Nersissian等^[26]研究认为植物特异的蓝铜蛋白参与植物的初级防卫反应。Ezaki等^[27]通过转基因研究发现拟南芥蓝铜蛋白基因 (*AtBCB*) 能增强转基因植物对铝胁迫的抗性。姜丽丽等^[28]将叶旋蒴苣苔的蓝铜蛋白类似基因转入马铃薯后,转基因植株对水分胁迫的抗性有显著提高。

蓝铜蛋白在自然界各种生物体中普遍存在,但其具体功能还不明确。笔者应用 FDD 技术克隆了一个在棉花纤维中特异表达的蓝铜蛋白基因 *GhBCP1*,从这个基因表达特征推测蓝铜蛋白在棉纤维发育中可能具有的功能。

4 结论

本试验首次从陆地棉中克隆了一个蓝铜蛋白基因 *GhBCP1*。*GhBCP1* 开放阅读框长度为 528 bp, 编码 176 个氨基酸,它在纤维细胞中特异表达且在纤维发育的初生壁向次生壁合成转换期 (18 DPA) 表达量最高。虽然目前笔者还不知道 *GhBCP1* 的确切功能,但从其表达特征可以推测该基因可能与棉纤维次生壁合成的起始有关。下一步计划构建 *GhBCP1* 的过量表达和抑制表达载体转化棉花,进一步研究该基因在棉花纤维发育中的功能。

References

- [1] Basra A S, Malik C P. Development of the cotton fiber. *International Review of Cytology*, 1984, 89: 65-113.
- [2] John M E, Crow L J. Gene expression in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) fiber: Cloning of the mRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1992, 89(13): 5769-5773.
- [3] John M E. Structural characterization of genes corresponding to cotton fiber mRNA, E6: Reduced E6 protein in transgenic plants by antisense gene. *Plant Molecular Biology*, 1996, 30(2): 297-306.
- [4] Ruan Y L, Llewellyn D J, Furbank R T. The control of single-cell cotton fiber elongation by developmentally reversible gating of plasmodesmata and coordinated expression of sucrose and K⁺ transporters and expansin. *The Plant Cell*, 2001, 13(1): 47-60.
- [5] Wang S, Wang J W, Yu N, Li C H, Luo B, Gou J Y, Wang L J, Chen

- X Y. Control of plant trichome development by a cotton fiber MYB gene. *The Plant Cell*, 2004, 16(9): 2323-2334.
- [6] Wang H Y, Yu Y, Chen Z L, Xia G X. Functional characterization of *Gossypium hirsutum* profilin 1 gene (*GhPFN1*) in tobacco suspension cells. Characterization of *in vivo* functions of a cotton profilin gene. *Planta*, 2005, 222(4): 594-603.
- [7] Delmer D P, Pear J R, Andrawis A, Stalker D M. Genes encoding small GTP-binding proteins analogous to mammalian rac are preferentially expressed in developing cotton fibers. *Molecular and General Genetics*, 1995, 248(1): 43-51.
- [8] Li Y L, Sun J, Xia G X. Cloning and characterization of a LRR receptor-like protein kinase gene associated with cotton fiber development. *Molecular Genetics and Genomics*. 2005, 273: 217-224.
- [9] Pu L, Li Q, Fan X P, Yang W C, Xue Y B. The R2R3 MYB transcription factor GhMYB109 is required for cotton fiber development. *Genetics*, 2008, 180: 811-820.
- [10] He Y J, Guo W Z, Shen X L, Zhang T Z. Molecular cloning and characterization of a cytosolic glutamine synthetase gene, a fiber strength-associated gene in cotton. *Planta*, 2008, 228(3): 473-483.
- [11] Sykes A G. Plastocyanin and the blue copper proteins. *Structure and Bonding*, 1991, 75: 175-224.
- [12] de Rienzo F, Gabdoulline R R, Menziani M C, Wade R C. Blue copper proteins: A comparative analysis of their molecular interaction properties. *Protein Science*, 2000, 9(8): 1439-1454.
- [13] 孙 杰, 李园莉, 汪若海, 夏桂先. 利用 mRNA 荧光差异显示技术规模化筛选棉纤维特异表达基因. 生物工程学报, 2004, 20(1): 39-42.
- Sun J, Li Y L, Wang R H, Xia G X. Identification of genes that are specifically/preferentially expressed in developing cotton fibers by mRNA fluorescence differential display (FDD). *Chinese Journal of Biotechnology*, 2004, 20(1): 39-42. (in Chinese)
- [14] 孙 杰, 李艳军, 李园莉, 汪若海. 维特异表达基因 *GhF1* 的分离及鉴定. 棉花学报, 2005, 17(5): 259-263.
- Sun J, Li Y J, Li Y L, Wang R H. Isolation and identification of specifically expressed gene *GhF1* in cotton fiber cells. *Cotton Science*, 2005, 17: 259-263. (in Chinese)
- [15] Nakamura K, Go N. Function and molecular evolution of multicopper blue protein. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2005, 62 (18): 2050-2066.
- [16] Adman E T. Copper protein structures. *Advances in Protein Chemistry*, 1991, 42: 145-197
- [17] Rydén L G, Hunt L T. Evolution of protein complexity: The blue copper-containing oxidases and related proteins. *Journal of Molecular Evolution*, 1993, 36(1): 41-66.
- [18] Sakurai T, Kataoka K. Structure and function of type I copper in multicopper oxidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2007, 64(19/20): 2642-2656.
- [19] Kim S, Mollet J C, Dong J, Zhang K, Park S Y, Lord E M. Chemocyanin, a small basic protein from the lily stigma, induces pollen tube chemotropism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2003, 100(26): 16125-16130.
- [20] Sedbrook J C, Carroll K L, Hung K F, Masson P H, Somerville C R. The Arabidopsis *SKU5* gene encodes an extracellular glycosyl phosphatidylinositol-anchored glycoprotein involved in directional root growth. *The Plant Cell*, 2002, 14(7): 1635-1648.
- [21] Dong J, Kim S T, Lord E M. Plantacyanin plays a role in reproduction in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 2005, 138(2): 778-789.
- [22] Drew J E, Gatehouse J A. Isolation and characterization of a pea pod cDNA encoding a pupative blue copper protein correlated with lignin deposition. *Journal of Experimental Botany*, 1994, 45(12): 1873-1884.
- [23] Bao W, O'malley D M, Whetten R, Sederoff R R. A laccase associated with lignification in loblolly pine xylem. *Science*, 1993, 260(5108): 672-674.
- [24] Davin L B, Wang H B, Crowell A L, Bedgar D L, Martin D M, Sarkanen S, Lewis N G. Stereoselective bimolecular phenoxy radical coupling by an auxiliary (dirigent) protein without an active center. *Science*, 1997, 275(5298): 362-366.
- [25] Hatfield R, Vermerris W. Lignin formation in plants: The dilemma of linkage specific center. *Plant Physiology*, 2001, 126(4): 1351-1357.
- [26] Nersissian A M, Immoos C, Hill M G, Hart P J, Williams G, Herrmann R G, Valentine J S. Uclacyanins, stellacyanins, and plantacyanins are distinct subfamilies of phytoeyanins: Plant-specific mononuclear blue copper proteins. *Protein Science*, 1998, 7(9): 1915-1929.
- [27] Ezaki B, Sasaki K, Matsumoto H, Nakashima S. Functions of two genes in aluminium (Al) stress resistance: repression of oxidative damage by the *AtBCB* gene and promotion of efflux of Al ions by the *NtGDII* gene. *Journal of Experimental Botany*, 2005, 56(420): 2661-2671.
- [28] 姜丽丽, 邸 宏, 林忠平, 胡鸢雷, 吴韩英, 崔少彬, 姜丽静, 卢翠华. 蓝铜蛋白类似基因 *BcBCP1* 转化马铃薯及其抗旱性的改良. 中国蔬菜, 2009(2): 7-11.
- Jiang L L, Di H, Lin Z P, Hu Y L, Wu H Y, Cui S B, Jiang L J, Lu C H. Agrobacterium-mediated transformation of potato with drought resistance gene *BcBCP1*. *China Vegetables*, 2009(2): 7-11. (in Chinese)

(责任编辑 毕京翠, 李 莉)