

猕猴桃 *AdCCS1* 基因的克隆及其表达调控

陈义挺, 冯 新*, 赖瑞联, 高敏霞, 陈文光, 吴如健

(福建省农业科学院果树研究所, 福州 350013)

摘 要: 采用 RT-PCR 法从‘米良 1 号’猕猴桃中分离到 1 066 bp 的铜锌超氧化物歧化酶分子伴侣蛋白基因 *AdCCS1*, 登录号为 KY471361。*AdCCS1* 的开放阅读框为 984 bp, 编码 327 个氨基酸, 包含 3 个典型结构域(N 端结构域、中间结构域和 C 端结构域)和 2 个保守的金属结合位点(MXCXXC 和 CXC)。基因结构分析显示 *AdCCS1* 由 6 个外显子和 5 个内含子组成。系统进化分析表明 *AdCCS1* 聚在双子叶植物分支中, 与茶树 *CsCCS* 的亲缘关系最近。此外, *AdCCS1* 的 5'端调控区存在多种光响应、胁迫响应和激素响应元件。定量 PCR 分析显示, *AdCCS1* 在猕猴桃叶片中的表达量最高, 其次是成熟果、花、幼果和茎, 在根中的表达量最低。猕猴桃果实中 *AdCCS1* 在 4 °C 低温贮藏过程中的表达量均比 25 °C 贮藏中同期的低, 说明低温抑制 *AdCCS1* 的表达。脱落酸和赤霉素处理后 *AdCCS1* 的表达下调, 但二者的应答模式不同。

关键词: 猕猴桃; *AdCCS1*; 贮藏温度; ABA; GA₃; 表达分析

中图分类号: S 663.4

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2018) 12-2371-12

Cloning and Expression Regulation of the *AdCCS1* from *Actinidia chinensis* var. *deliciosa*

CHEN Yiting, FENG Xin*, LAI Ruilian, GAO Minxia, CHEN Wenguang, and WU Rujian

(Fruit Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China)

Abstract: Copper/zinc superoxide dismutases (Cu/Zn SOD), acting as an essential antioxidant enzyme, play important roles in plant growth and development, stress response and fruit senescence, while their activities depended on the copper chaperone for Cu/Zn SOD (CCS) to delivering copper to them. Therefore, CCS is also involved in the plant growth and development and stress response. In this study, a 1 066 bp gene of copper chaperone for Cu/Zn SOD (*AdCCS1*) was isolated from *Actinidia chinensis* var. *deliciosa* ‘Miliang 1’ by using reverse transcription (RT-PCR), and its accession number was KY471361. The *AdCCS1* gene had an open reading frame of 984 bp and encoded 327 amino acids, which contained three typical domains (N-terminal domain, central domain and C-terminal domain) and two conserved metal binding sites (MXCXXC and CXC). Gene structure analysis showed that *AdCCS1* gene consisted of six exons and five introns. Phylogenetic analysis revealed that *AdCCS1* was clustered in the

收稿日期: 2018-08-15; **修回日期:** 2018-12-11

基金项目: 福建省农业科学院博士科研启动基金项目 (DC2017-2); 福建省农业科学院青年英才计划项目 (YC2017-2); 福建省自然科学基金项目 (2018J05051, 2017J01044); 福建省属公益类科研院所基本科研专项 (2018R1013-2, 2015R1014-3); 福建省农业科学院科技创新团队建设项目 (STIT2017-3-6)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: fujiankiwifruit@163.com)

dicotyledonous branch with close relation to tea CsCCS. In addition, a variety of *cis*-acting elements associated with light response, stress response and hormone response were present in the 5' terminal regulatory region of the *AdCCS1* gene. Quantitative PCR analysis showed that *AdCCS1* was expressed strongly in kiwifruit leaves, followed by ripe fruits, flowers, young fruits and stems, but weakly in roots. The expression level of *AdCCS1* in kiwifruits stored at 4 °C was lower than that of the same time stored at 25 °C, which suggested that low temperature inhibit the expression of *AdCCS1*. The expression of *AdCCS1* in fruits was down-regulated after being treated with abscisic acid and gibberellin, while their expression patterns were different.

Keywords: *Actinidia chinensis*; *AdCCS1*; storage temperature; ABA; GA₃; expression analysis

铜是植物必需的微量营养元素, 通常作为细胞色素氧化酶、漆酶和铜锌超氧化物歧化酶等的必需辅因子, 参与生物体的电子传递和氧化还原等过程, 在细胞的新陈代谢和植物的生长发育中发挥重要作用 (Kim et al., 2008)。同时, 铜是一种具有氧化还原活性的金属, 容易产生对细胞具有毒害作用的活性氧 (Ravet & Pilon, 2012)。植物在演化过程中已发展了一套系统的铜代谢调控机制, 以实现细胞中铜的吸收、分配和排出的精确控制, 避免产生毒害。细胞内铜的转运与调节主要由铜分子伴侣蛋白实现。植物的铜分子伴侣蛋白是一个大家族, 根据其具体功能分为 3 类。第 1 类是与酵母 ATX1 同源的 CCH 蛋白, 负责铜的运输和活性氧清除 (Himelblan et al., 1998); 第 2 类是与酵母 COX17 同源的 COX17 蛋白, 负责将铜运送到细胞色素氧化酶分子上以修复中断的电子传递链 (Balandin & Castresana, 2002); 第 3 类是与酵母 Lys7 同源的 CCS 蛋白 (Copper chaperone for Cu/Zn SOD, CCS), 负责运送铜给铜锌超氧化物歧化酶, 并激活其活性 (Zhu et al., 2000)。

铜锌超氧化物歧化酶 (Cu/Zn superoxide dismutase, Cu/Zn SOD) 是植物生长发育和逆境响应的重要抗氧化酶, 但赋予 Cu/Zn SOD 活性的铜离子需由分子伴侣 CCS 提供 (Forman & Fridovich, 1973; Rae et al., 1999)。诸多研究表明 CCS 也参与植物的生长发育和逆境响应进程。龙眼的 *DlCCS* 在体胚发生过程中差异表达, 其转录本随着体胚的发育呈递增趋势, 在成熟胚阶段达到最高峰 (林玉玲和赖钟雄, 2012)。巨尾桉的 *EuCCS* 在幼叶等生长旺盛的组织中表达量较大, 随着叶片衰老, 表达水平随之下降 (赵艳玲和姚婕, 2017)。环境中过量的铜可以显著上调大豆的 *GmCCS* 表达 (Sagasti et al., 2014), 而干旱胁迫明显下调杨树的 *PtCCS* 表达 (Molina-Rueda et al., 2013)。香蕉的 *MaCCS* 不仅参与对光、冷、热和干旱等非生物胁迫的应答, 还受 ABA 和 IAA 等激素的诱导表达 (Feng et al., 2016)。植物中 miRNA 可以通过降解靶基因转录本或抑制靶基因翻译的方式在转录后水平和翻译水平调控靶基因的表达。在拟南芥 miRNA 的研究中发现, miR398 介导 *AtCCS* 基因 mRNA 的降解和翻译, 进而影响 Cu/Zn SOD 的活性 (Beauclair et al., 2010)。

近年, 植物 CCS 基因已从番茄 (Zhu et al., 2000)、马铃薯 (Trindade et al., 2003) 等多种植物中分离, 但研究主要集中在结构域功能、与 Cu/Zn SOD 的互作、逆境胁迫应答等方面 (Sagasti et al., 2011; 姚婕和赵艳玲, 2014), 对其在果实采后贮藏中的作用未见报道。猕猴桃 (*Actinidia chinensis*) 果实不耐贮藏 (黄文俊和钟彩虹, 2017; 梁春强 等, 2017)。低温贮藏可延缓其采后衰老, 延长货架期 (张美芳 等, 2014; 陈义挺 等, 2017)。此外, 脱落酸 (ABA) 等激素处理也会影响猕猴桃果实的软化衰老进程 (陈昆松 等, 1999; Kongsuwan et al., 2017; 李桦 等, 2017)。早期的研究表明, 超氧化物歧化酶活性在猕猴桃采后贮藏中变化明显 (吕均良 等, 1993; 陈金印, 2004), 但其分子伴侣蛋白基因的表达情况未见报道。鉴于此, 本研究中以猕猴桃为材料, 在克隆 *AdCCS1* 基因

序列的基础上, 对其编码蛋白的特性、功能结构域、系统进化关系、基因结构、启动子区的顺式作用元件和调控 miRNA 进行分析, 并研究其在不同组织部位、不同贮藏温度和激素处理后的表达模式, 为探索铜分子伴侣、超氧化物歧化酶与猕猴桃采后贮藏之间的关系提供新线索。

1 材料与方法

1.1 材料与处理

以福建省农业科学院果树研究所猕猴桃种植基地的‘米良 1 号’猕猴桃 (*Actinidia chinensis* var. *deliciosa* ‘Miliang 1’) 为供试材料, 分别取根、茎、叶、花、幼果 (花后 16 d) 和成熟果 (花后 160 d), 用液氮速冻, 保存于 -80°C 冰箱待用。

以 2017 年的成熟果 (花后 160 d) 为材料, 选择大小、可溶性固形物含量和硬度等相近的果实, 待散去田间热后, 分别进行 25°C 贮藏处理 (对照, 取样时间分别为贮藏 0、1、3、5、7、9、11 d)、 4°C 贮藏处理 (取样时间分别为贮藏 0、1、3、5、7、9、11 d)、 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA 浸果 2 min 后 25°C 贮藏处理 (取样时间分别为贮藏 0、1、3、5、7、9 d) 和 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GA_3 浸果 2 min 后 25°C 贮藏处理 (取样时间分别为贮藏 0、1、3、5、7、9、11 d)。处理结束后用液氮速冻, 并保存于 -80°C 冰箱待用。每样品重复 3 次。

1.2 核酸的提取及 cDNA 合成

利用 TIANGEN 的 RNAPrep Pure Plant Kit (北京) 试剂盒提取成熟果的总 RNA, 经紫外分光光度计法和 1.0% 琼脂糖凝胶电泳法检测, 质量合格的总 RNA 采用 RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, USA) 试剂盒逆转录为 cDNA, 用于基因的克隆验证。

采用 CTAB 法 (Stewart & Via, 1993) 提取猕猴桃 DNA, 用于基因组序列和 5' 端调控序列克隆。

1.3 引物设计与 PCR 扩增

根据已公布的‘红阳’猕猴桃 (*Actinidia chinensis* var. *chinensis* ‘Hongyang’) 基因组数据库 (<http://bdg.hfut.edu.cn/kir/search.html>; Huang et al., 2013) 中注释为铜锌超氧化物歧化酶伴侣蛋白基因的序列 (编号 Ach14g317331), 设计引物 CCS-F (5'-AGAGAGTCACTACGCAGAGTC-3') 和 CCS-R (5'-CTCCAAACTCTATTGAGCAAGTAC-3'), 扩增‘米良 1 号’猕猴桃的 *AdCCSI* 及其基因组 (genomic DNA, gDNA) 序列。以‘红阳’猕猴桃基因组中 CCS 基因的起始密码子 (ATG) 上游 1 500 bp 的 gDNA 序列为参考, 设计上游引物 CCSpro-F (5'-TGTGGTAATGCTGGAGTAACAAC-3'), 并在 *AdCCSI* 起始密码子 (ATG) 的下游设计特异的下游引物 CCSpro-R (5'-GGCGACGAAGATGAAGATGAAG-3'), 扩增 *AdCCSI* 的 5' 端调控序列。PCR 扩增条件为: 94°C 3 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 60 ~ 200 s, 循环 35 次; 72°C 10 min。

1.4 *AdCCSI* 的生物信息学分析

利用 NCBI 数据库的 BLAST 功能分析 *AdCCSI* 与其他植物 CCS 基因的同源性。随后采用在线软件 ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>)、ProtComp v9.0 (<http://linux1.softberry.com>; <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>)、NetPhos 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)、PredictProtein (<https://www.predictprotein.org/>) 和 Swissmodel (<http://swissmodel.expasy.org/>) 分别对猕猴桃 *AdCCSI* 编码蛋白的基本理化性质、亚细胞定位情况、叶绿体运输肽、磷酸化位点、二

级结构及三级结构进行预测分析。使用 ClustalX 软件将 *AdCCS1* 的氨基酸序列与其他植物 CCS 序列进行多重比对。采用 psRNA Target (<http://plantgrn.noble.org/psRNA/Target/>) 在线软件分析调控 *AdCCS1* 的 miRNA, Expectation 阈值为 3.5, 其他参数为默认值。应用 Mega 软件的邻位相连法 (Neighbor-Joining) 构建猕猴桃与其他植物 CCS 的分子系统进化树。采用 Gene Structure Display Server (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 在线工具绘制 *AdCCS1* 的基因结构图。根据 PlantCARE 数据库 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 分析 *AdCCS1* 5'端调控序列的顺式作用元件。

1.5 *AdCCS1* 的实时荧光定量 PCR 分析

各样品分别取 500 ng 总 RNA 作为模板,参照 TransScript[®] All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (One-Step gDNA Removal; TransGen, Beijing) 说明书合成第一链 cDNA。根据获得的 *AdCCS1* 序列设计荧光定量引物 CCS-QF (5'-GGTGACCTGGGAACACTAAA-3') 和 CCS-QR (5'-TCACTTCCGTACAACGCTATG-3')。以猕猴桃 *Actin isoform B* (*ACTB*) 作为内参基因 (张慧琴等, 2015), 引物为 ACTB-QF (5'-GTGCTCAGTGGTGGTTCAA-3') 和 ACTB-QR (5'-GACGCTGTA TTTCTCTCAG-3')。在 Eppendorf 荧光定量 PCR 仪上进行扩增, 扩增程序为: 94 °C 预变性 30 s; 94 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 10 s, 40 个循环。PCR 循环结束立即进行熔解, 程序为 94 °C 15 s, 60 °C 15 s, 再升温至 94 °C 保持 15 s。在 Eppendorf 的 Mastercycler[®] ep realplex 软件中自动生成标准曲线、熔解曲线和样品 Ct 值。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 *AdCCS1* 在各样品中的相对表达量, 应用 SPSS 软件的 One-way ANOVA 分析基因表达量的差异显著性, 最后采用 Excel 绘制图表。

2 结果与分析

2.1 *AdCCS1* 及其 gDNA 序列的克隆

以‘米良 1 号’猕猴桃 cDNA 为模板, CCS-F 和 CCS-R 为引物, 经 RT-PCR 扩增得到 *AdCCS1* 全长 1 066 bp (图 1, A), 包含 1 个 984 bp 的完整开放阅读框 (open reading frame, ORF), 编码 327 个氨基酸。

采用 NCBI 数据库进行 BLAST 分析, 结果表明 *AdCCS1* 与茶树 *CsCCS* (*Camellia sinensis*, KP337338)、葡萄 *VvCCS* (*Vitis vinifera*, AFU52882)、龙眼 *DICCS* (*Dimocarpus longan*, AKE81025) 和大豆 *GmCCS* (*Glycine max*, AF329816) 具有很高的同源性, 相似性分别为 87%、81%、81% 和 80%。*AdCCS1* 与‘红阳’猕猴桃同源基因 *Ach14g317331* 的核苷酸相似性为 94.75%, 氨基酸相似性为 94.83%。

以 DNA 为模板, CCS-F 和 CCS-R 为引物, 经 PCR 扩增得到 *AdCCS* 的 gDNA 序列为 3 414 bp (图 1, B)。将 *AdCCS* 及其 gDNA 序列提交 GenBank 数据库, 登录号分别为 KY471361 和 MG720543。

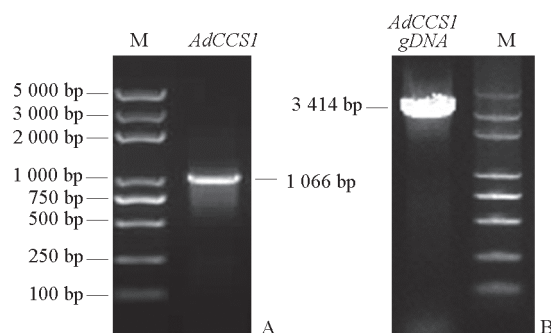


图 1 *AdCCS1* 及其 gDNA 的扩增
Fig. 1 Amplification of the *AdCCS1* and its gDNA

2.2 *AdCCS1* 的生物信息学分析

2.2.1 *AdCCS1* 编码蛋白的基本特征

采用 ExPASy 数据库的 ProtParam 工具对 *AdCCS1* 蛋白的分析结果显示, *AdCCS1* 的分子量为 34 583.21 D, 等电点为 5.89, 总亲水性值为 -0.059, 不稳定系数为 42.54, 所带正电氨基酸数与负电氨基酸数分别为 31 和 34, 说明 *AdCCS1* 是不稳定的酸性蛋白, 具有亲水性。应用 ProtComp v9.0 预测亚细胞定位情况, 结果显示 *AdCCS1* 蛋白定位在细胞质和叶绿体的可能性最大, 这与 ChloroP1.1 分析显示 *AdCCS1* 蛋白的 N 端具有一段 59 aa 的叶绿体运输肽相符。采用 NetPhos 3.1 软件预测蛋白的磷酸化位点, 结果表明 *AdCCS1* 多肽链上共存在 42 个潜在的磷酸化位点, 其中 31 个为丝氨酸磷酸化位点, 11 个为苏氨酸磷酸化位点, 不存在酪氨酸磷酸化位点。PredictProtein 在线工具预测结果表明, *AdCCS1* 还具有 1 个 N 端糖基化位点, 4 个蛋白激酶 C 磷酸化位点, 5 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点, 6 个 N-乙酰化位点, 1 个酰胺化位点和 1 个微体 C 端定位信号。对 *AdCCS1* 蛋白的二级结构分析表明, *AdCCS1* 中无规则卷曲所占比例最大, 为 61.16%, 其次是 β -折叠, 占 29.36%, α -螺旋仅占 9.48%, 这与其三维结构的预测结果相一致。

进一步采用 ClustalX 软件将 *AdCCS1* 编码的氨基酸序列与其他物种氨基酸序列进行多重比对分析, 结果 (图 2) 显示所有比对序列都含有植物 CCS 的 3 个典型结构域, 即包含保守金属结合位点

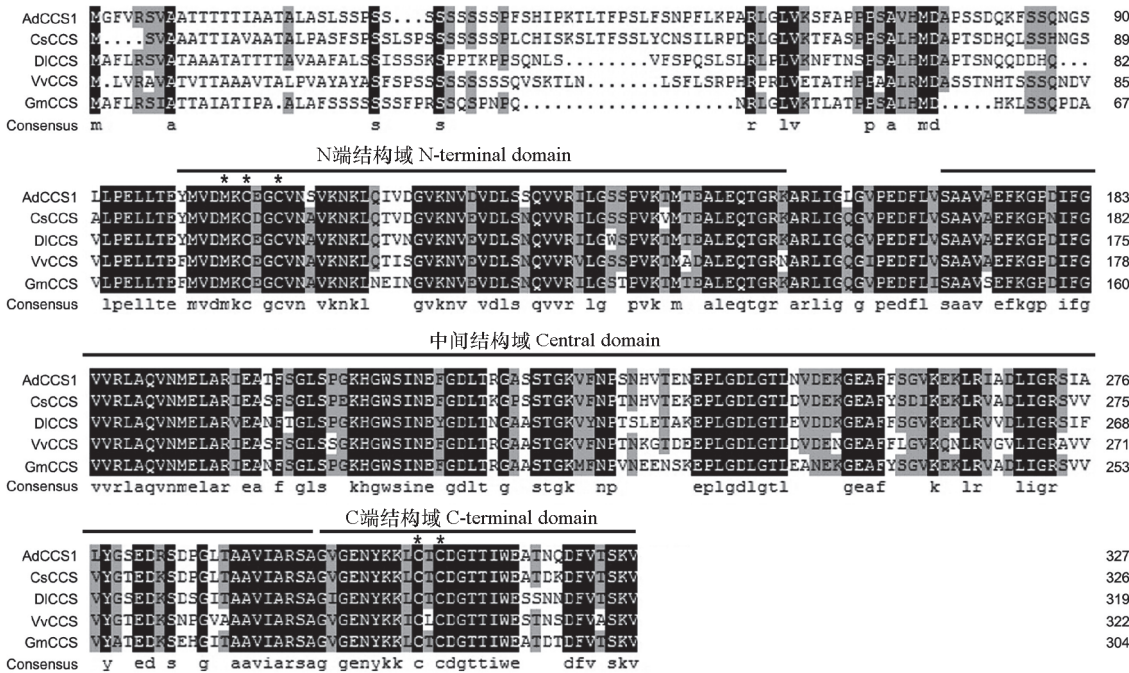


图 2 *AdCCS1* 与其他植物 CCS 序列的多重比对分析

一致性为 100% 的氨基酸序列用黑色阴影表示, 一致性较低的用灰色阴影表示。星号标注的氨基酸位点为保守的金属结合位点 (MXCXXC 和 CXC)。

AdCCS1: 猕猴桃; *CsCCS*: 茶树; *DiCCS*: 龙眼; *VvCCS*: 葡萄; *GmCCS*: 大豆。

Fig. 2 Multiple sequence alignments of the *AdCCS1* and other plant CCS

Identical conserved residues are shaded in black, while similar residues are shaded in gray. Residues annotated with asterisks are conserved metal-binding motifs (MXCXXC and CXC).

AdCCS1: *Actinidia chinensis* var. *deliciosa*; *CsCCS*: *Camellia sinensis*; *DiCCS*: *Dimocarpus longan*; *VvCCS*: *Vitis vinifera*; *GmCCS*: *Glycine max*.

MXCXXC 的 N 端结构域、与铜锌超氧化物歧化酶序列同源的中间结构域和包含金属结合位点 CXC 的 C 端结构域, 这 3 个结构域分别在铜离子获取、识别铜锌超氧化物歧化酶、并向铜锌超氧化物歧化酶中插入铜离子进而激活铜锌超氧化物歧化酶中发挥作用 (Schmidt et al., 2000; Lamb et al., 2001; Chu et al., 2005)。

2.2.2 调控 *AdCCS1* 的 miRNA 预测与分析

采用在线工具 psRNA Target (Dai & Zhao, 2011) 和猕猴桃果实 miRNA 数据库对调控 *AdCCS1* 的 miRNA 进行分析, 结果表明, 猕猴桃 *AdCCS1* 的表达受 miR398、miR398a-3p 和 miR166i-3p 的调控, 其中 miR398 和 miR398a-3p 是通过裂解靶基因 mRNA 的方式调控 *AdCCS1* 的表达, 而 miR166i-3p 则是通过抑制靶基因翻译的方式调控 *AdCCS1* 的表达。

2.2.3 *AdCCS1* 的系统进化分析

为了分析猕猴桃 *AdCCS1* 的系统进化情况, 采用 Mega 软件的邻位相连算法对猕猴桃和其他 21 种植物的 CCS 蛋白序列进行聚类分析, 结果 (图 3) 显示共分成两大分支, 蕨类植物门的卷柏 *SmCCS* 和裸子植物门的北美云杉 *PsCCS* 聚在同一大分支, 其他 20 种被子植物的 CCS 聚在另一大分支。其中被子植物分支又包含两个小分支, 分别为单子叶植物分支和双子叶植物分支。*AdCCS1* 聚在双子叶植物分支中, 与茶树 *CsCCS* 的亲缘关系最近。可见, *AdCCS1* 与其他植物 CCS 一样, 具有明显的种属特征, 在进化上较为保守。

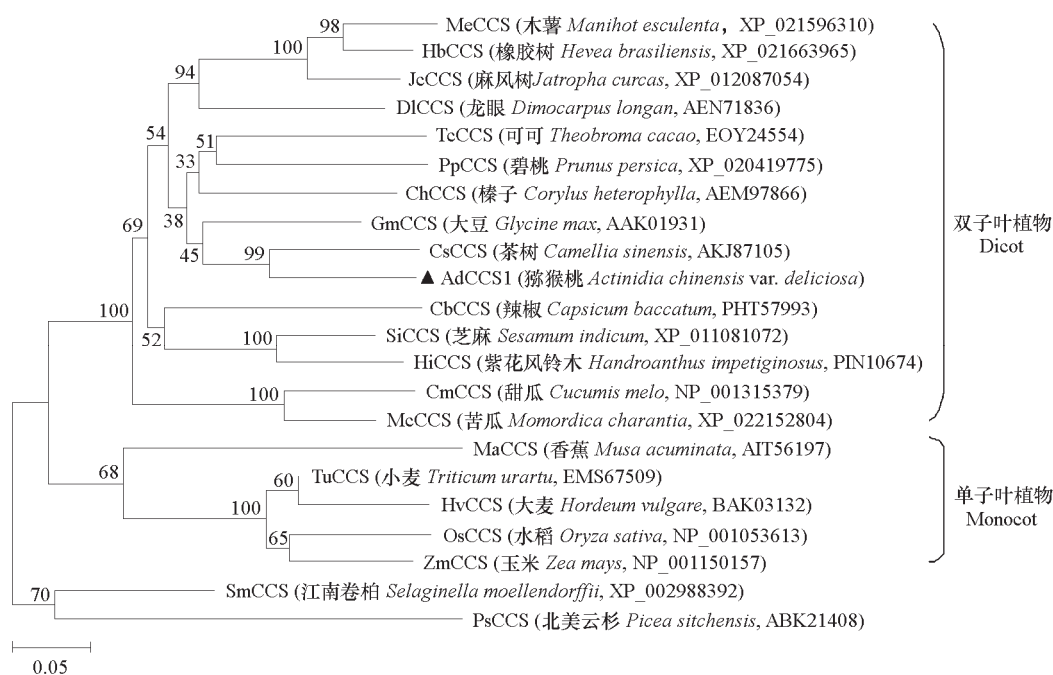


图 3 不同物种 CCS 蛋白的系统进化树

分支节点的数字表示 Bootstrap 验证中基于 1 000 次重复时该节点的可信度的百分比。

Fig. 3 Phylogenetic tree of the CCS proteins from various plant species

Numbers at the nodes represent the reliability percent of Bootstrap values on 1 000 replications.

2.3 *AdCCS1* 的基因结构分析

采用 Gene Structure Display Server 工具构建 *AdCCS1* 的基因结构图, 结果如图 4 所示, *AdCCS1*

由 6 个外显子和 5 个内含子组成。其中外显子大小分别为 261、27、73、135、224 和 264 bp，内含子大小分别为 450、180、119、1 130 和 469 bp。内含子剪切位点分析结果表明，*AdCCSI* 的 5 个内含子均在“GT-AG”处剪切，符合真核生物内含子的剪接规律。

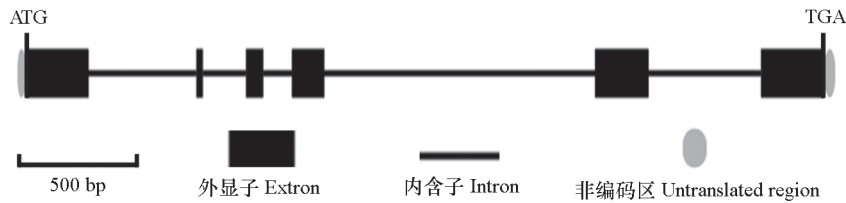


图 4 *AdCCSI* 的基因结构
Fig. 4 Genomic structure of the *AdCCSI* gene

2.4 *AdCCSI* 5' 端调控序列的获得及其特征分析

为了分析 *AdCCSI* 启动子区的调控元件，以 DNA 为模板，CCSpro-F 和 CCSpro-R 为引物，经 PCR 扩增得到 *AdCCSI* 的 5'端调控序列，共 1 334 bp。将序列提交到 PlantCARE 数据库进行顺式作用元件分析，结果如图 5 所示，在起始密码子 ATG 上游 - 268 ~ - 275 bp 处存在核心启动子元件 TATA-box，在 - 226 ~ - 233 bp 和 - 238 ~ - 243 bp 处具有 CAAT-box。

除了具有典型的 TATA-box 和 CAAT-box 外，该序列包含的主要顺式元件可归类为 3 种：第 1 种是光响应元件，分别是 ACE、Box-4、G-box、G-Box、Box-I、GA-motif、GAG-motif、GATA-motif 和 chs-CMA2a；第 2 种是胁迫响应元件，包括厌氧元件 ARE、热胁迫元件 HSE、响应干旱的 MYB 结合位点 MBS 及防御与胁迫元件 TC-rich repeats；第 3 种是激素响应元件，包括脱落酸元件 ABRE、乙烯元件 ERE、赤霉素元件 GARE-motif 及茉莉酸甲酯元件 CGTCA-motif 和 TGACG-motif。此外，还含有 2 个生理节奏调控元件 circadian、2 个胚乳表达元件 Skn-1 motif、1 个 AC-I 及 1 个与富含 AT 的 DNA 结合蛋白 ATBP-1 结合的元件。推测 *AdCCSI* 的表达可能受光、非生物胁迫和激素调控。

2.5 *AdCCSI* 的表达分析

AdCCSI 在所有被检测的猕猴桃组织（根、茎、叶、花、幼果和成熟果）中均有表达，在根中的表达量最低，叶片中的表达量最高，是根中的 13.6 倍，其次是成熟果、花、幼果和茎，分别是根中的 4.8 倍、4.2 倍、3.1 倍和 3.0 倍（图 6）。

25 °C 贮藏的猕猴桃果实中 *AdCCSI* 的表达量在前 3 d 略有下降，从 5 d 开始显著上升，在 9 d 时达到最大值（表达量是 0 d 的 5.58 倍），之后再次下降。4 °C 低温贮藏的猕猴桃果实中 *AdCCSI* 的表达量在前 5 d 显著下调，7 d 时略有上升（表达量是 0 d 的 94%），之后再次下降，且均比 25 °C 贮藏中同时期的低（图 7），说明低温抑制 *AdCCSI* 的表达。

不同激素处理后果实中 *AdCCSI* 的表达模式如图 7 所示，在 ABA 处理后的 1 ~ 9 d 中 *AdCCSI* 的表达量均显著下降 ($P < 0.05$)；在 GA₃ 处理后，*AdCCSI* 在 1、3 和 5 d 时表达量下降为 0 d 的 91%、48% 和 56%，7 d 时上升至 0 d 的 90%，之后再次下降为 0 d 的 47%。可见，猕猴桃 *AdCCSI* 对不同激素的应答模式不同。ABA 和 GA₃ 处理后果实中 *AdCCSI* 的表达量在贮藏前 3 d 的下降幅度较同时期的 25 °C 贮藏中的下降幅度慢，且随着贮藏时间的推移其表达量仍维持在较低水平，而 25 °C 贮藏

中同时期的表达量显著升高。

-1 334	<u>TGTGGTAATGCTGGAGTAACAACACATTATATAGAAAAACAAAAGTGAGTGTGAGAGTGTGTGTGTGTGTGTGT</u>	(+) AT-rich element
-1 260	GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGGAGACTGTGGAGTCTACAATGGCTGCCTTCTGCTAAAGTTAGTAGTATTGAGGTTTGGACTTTGAG	
-1 170	<u>GATGTTTCTTGGGATGTGTTTATGAGAGATGGACAATTGAAGAACTTGAAGTAATGAGGCGCTTGGTAATCCTCGCAATTCCATTG</u>	(+) ARE (-) circadian (+) GAG-motif (-) TC-rich repeats (+) chs-CMA2a
-1 080	TGCTAAGAACAAAGCTGCGATTAGTGTAGGTAATGAAATTTTACATGTGTGCGAGCTTGTAAATTTTGAAGACTGCTAATTGAAACGC	(-) G-Box
-990	CAACTATTCTTTTTTTTATGTATATAACTTGGTAGCCGCTCCATTGGATCCTACGAATTCGGAAAAATCAATTCTATCGTCATAAGTGGGG	(+) circadian/(-) TGACG motif/(+) CGTCA-motif/(+) Skn-1 motif
-900	GTTATTTAAAGTTGGGGCAAAGTCTCGAATGAACTGACCAATACAAAAATTGATAATACGTGAGTGAAAGTTAAACCCCAAACTAAAAA	(-) ACE/(+) ABRE/(-) G-Box/(+) G-box
-810	CTTGGTAGTCTATCACTCATACAACCAATGCAGCTGAAATGTCAACTGTTATTAGTGTTTATTAGTAGTACTTATTGTTTGAAGT	(-) ARE (+) MBS
-720	GTTGCAAAAAATTATGATTTTAAATTAATAAAAAAACTATCGAACAACTCTAAATCATCTCCAAAACCTATTTTGGAGTTGGAAGCTAC	(-) GAG-motif
-630	<u>TCTAACCCACCTCCAAATTTGATCTCCATAACTTTTAGTATATAAATCCAAATATTGTATAACTTACACCATTAAAAAGATATTAACAAAC</u>	(+) AC-I
-540	ATCTTTTAAATAAGATTAATATTGAATATATTTAATAACAATTACAAAAATAAGATAATTTAAATTTTGGAGAGAATTAGTTGTTTTTTT	(+) GATA-motif/(-) Box 4 (-) TC-rich repeats
-450	ATCTTTTTTGTAAATTTCTAATACCACCAATGTACTTTGTAATTTTTTCTATATACTTCTAAAAATGTACAACTCCATGTCAAAAAAT	(-) HSE
-360	TTATATTTTGTAAATTTGGTACTATTAAAAAGATATGACGTTATCTTTAAATGAGTTAATTTTAAACATATTAATAAAAAATTTAA	(-) CGTCA-motif/(+) TGACG motif (+) TATA-box
-270	<u>AAATCACCCTTCATAGTAAATAAAATCCAATTTAGGCCCAATTGGCTTTTTTTTTTTTTTTTGAATGGTGACACGTCATTGTAGG</u>	(+) CAAT-box (+) CAAT-box (-) Box I/(-) ERE (+) G-box/(+) CGTCA-motif/(-) TGACG motif/(+) Skn-1 motif
-180	TGCACCTTCCATATTAAAGCTTAAATGGGCTGGACTTGGCTTCTGATTCCACACTTCGGAAAGGCCCATAGATAACGAGTGCGGCC	(+) GA-motif
-90	GATAACGGTGCTATCGATTCTAGTAAGAACAGAGAGAGAGAGAGAGAGTTAAGTCACTACGCAGAGTCAAAAATAAAAAAAA	(+) GARE-motif (+) GAG-motif
1	<u>ATG</u> GGATTGTGAGGTGAGTGGCAGCCACAACAACGACGCCATCGACGTACCGCTCTGCTTCTCTCTCTCCATCTTCATCTTCA	
91	<u>TCTTCATCTTCGTCGCC</u>	

图 5 *AdCCSI* 的 5'端调控序列及其潜在的顺式作用元件

起始密码子 (ATG) 用方框标注, 并将首字母 A 标记为 +1; 引物序列用双下划线标注; 顺式作用元件序列用单下划线标注, 并在下方标出元件名称, 括号中的加号与减号分别表示正向与反向。

Fig. 5 The 5-prime regulatory sequence of *AdCCSI* gene and its potential *cis*-acting elements

The start codon (ATG) is boxed, and coordinates give nucleotide position relative to the first letter A (+1). Primer sequences are underlined with double underscores. The sequences of *cis*-acting elements are underlined with single underscores and the names of the elements are given below. The plus and minus signs in parentheses indicate forward and reverse, respectively.

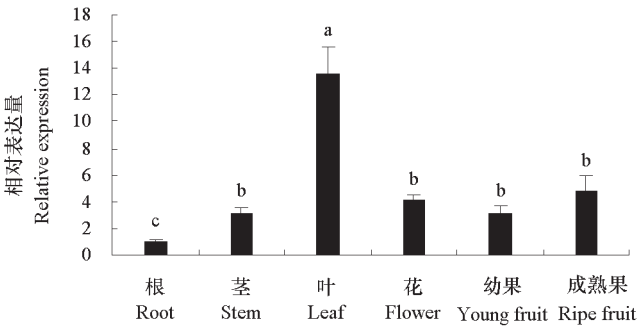


图 6 *AdCCS1* 在猕猴桃不同组织部位的相对表达量

Fig. 6 Relative expression of the *AdCCS1* in different tissues of kiwifruit
 $P < 0.05$.

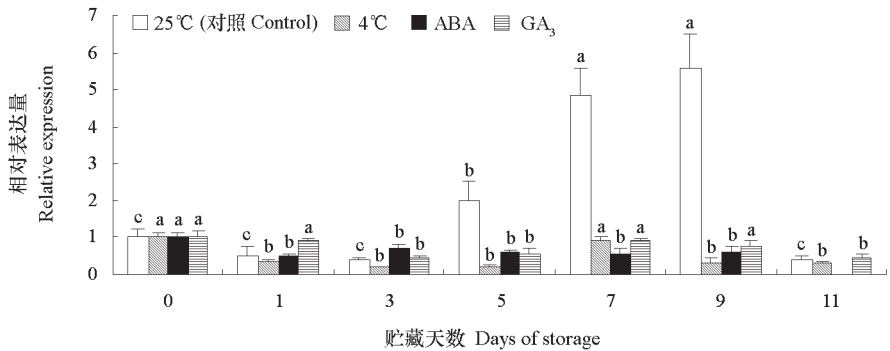


图 7 低温贮藏下和 ABA、GA₃ 处理后猕猴桃果实中 *AdCCS1* 的相对表达量

Fig. 7 Relative expression of the *AdCCS1* in kiwi fruits under lower temperature storage and after ABA and GA₃ treatments
 $P < 0.05$.

3 讨论

本研究获得的猕猴桃 *AdCCS1* 基因编码蛋白含有植物 CCS 的 3 个典型结构域（N 端结构域、中间结构域和 C 端结构域）和 2 个保守的金属结合位点（MXCXXC 和 CXC），说明 *AdCCS1* 与其他植物 CCS 一样具有获取铜、识别铜锌超氧化物歧化酶并将铜插入到铜锌超氧化物歧化酶活性位点进而激活其活性的功能。不仅如此，*AdCCS1* 与已报道的植物 CCS 具有相同的基因结构，即由 6 个外显子和 5 个内含子组成。虽然不同物种 CCS 基因的大小和内含子长度存在明显差异，但 *AdCCS1* 基因的第 3 个和第 4 个外显子的长度在进化上高度保守，与香蕉、水稻、玉米、拟南芥、大豆、苜蓿和葡萄 CCS 基因中对应外显子的长度一样（Feng et al., 2016），分别为 73 和 125 bp。结合结构域分析可知，第 3 个和第 4 个外显子编码蛋白正好包含 N 端结构域，推测这 2 个外显子长度的高度保守与其结构域对铜的精确调控有关。此外，属于双子叶植物纲的猕猴桃，其 *AdCCS1* 的第 5 个外显子为 224 bp，这进一步验证了 Feng 等（2016）的研究推断，即植物 CCS 基因的第 5 个外显子长度仅在单子叶植物间（221 bp）或双子叶植物间（224 bp）保守，可作为单、双子叶植物 CCS 的典型特征。有意思的是，Wei 等（2018）对茶树（*Camellia sinensis*）和猕猴桃全基因组进化的分析结果表明，茶树和猕猴桃是从大约 8 000 万年前的共同原始祖先中分化而来。本系统进化分析结果显

示 *AdCCSI* 聚在双子叶植物分支, 与茶树 *CsCCS* 的亲缘关系最近, 这与 Wei 等 (2018) 的研究结果相符。可见, 植物 *CCS* 在进化上高度保守, 并具有典型的种属特征。

虽然 *AdCCSI* 与其他植物 *CCS* 基因在结构域、内含子外显子组成和系统进化上高度保守, 但在表达调控方面存在差异。*AdCCSI* 在猕猴桃叶片中的表达量最高, 其次是成熟果、花、幼果和茎, 在根部的表达量最低。而拟南芥 *AtCCS* 在花中高表达, 在莲座叶、茎和叶中低表达 (Chu et al., 2005)。马铃薯中则存在 2 个 *CCS* 基因, 其中 1 个 *CCS* 基因仅在块茎中表达, 另一个 *CCS* 基因在叶中表达 (Trindade et al., 2003)。此外, Beauclair 等 (2010) 的研究表明拟南芥 *AtCCS* 的表达受 miR398 的调控, 转基因和序列突变证实拟南芥 miR398 是采用降解靶基因 mRNA 或抑制翻译的方式对 *AtCCS* 表达量进行调控。本研究中对调控 *AdCCSI* 相关 miRNA 的预测分析发现, *AdCCSI* 的表达不仅受 miR398 和 miR398a-3p 的调控, 还可能受 miR166i-3p 的调控, 但这 3 个 miRNA 对 *AdCCSI* 表达的具体调控方式仍待进一步的试验验证。基因的启动子区包含各种顺式作用元件, 是基因转录表达的重要调控区 (聂丽娜 等, 2008)。本研究中分离到的 *AdCCSI* 的 5' 端调控序列共 1 334 bp, 包含多种顺式元件, 如 9 种光应答元件、5 种激素响应元件、4 种胁迫应答元件和若干生理节奏调控元件 circadian 等。而香蕉 *MaCCS* 基因启动子区含有 10 种光应答元件 (Sp1、I-box、G-box、G-Box、ACE、ATCT-motif、MRE、ATCC-motif、GAG-motif 和 GATA-motif)、5 种激素响应元件 (ABRE、motif IIb、CGTA-motif、TGACG-motif、TGA-element) 和 5 种胁迫应答元件 (Box-W1、GC-motif、ARE、HSE 及 TC-rich repeats) 等 (Feng et al., 2016)。不同物种 *CCS* 基因的表达模式差异可能与其启动子区顺式元件的类型和数量不同有关。

SOD 酶活性与果实衰老密切相关, 衰老越快的果实中自由基的产生量越多, 其 SOD 活性也越强 (吕均良 等, 1993)。相对室温贮藏, 低温贮藏可以有效延缓猕猴桃果实的采后衰老, 延长贮藏时间 (张美芳 等, 2014)。陈金印 (2004) 对 ‘金魁’ 猕猴桃在 0 °C 低温和室温贮藏过程中 SOD 酶活性变化研究发现, 果实 SOD 活性在 0 °C 低温贮藏过程中一直处于低水平, 25 d 时才出现活性高峰 (峰值为 $10.96 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FW}$), 之后缓慢降回较低水平; 而在室温条件下贮藏, 果实 SOD 活性迅速升高, 10 d 时就出现活性高峰 (峰值为 $20.60 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FW}$), 之后下降; 说明低温可以推迟果实 SOD 活性高峰的出现, 并降低酶活性。本研究中, 猕猴桃果实 *AdCCSI* 在 4 °C 低温和 25 °C 常温贮藏过程中呈现类似表达模式, 即在整个 4 °C 低温贮藏过程中 *AdCCSI* 的表达量均维持在较低水平, 而在 25 °C 常温贮藏 5 d 开始显著上升, 9 d 时达到峰值 (表达量是 0 d 的 5.58 倍), 之后迅速下降。相似的表达模式暗示 *AdCCSI* 可能通过影响 SOD 酶活性, 参与猕猴桃果实在不同贮藏条件下的衰老进程, 进而影响果实的贮藏性。此外, 脱落酸和赤霉素处理可以下调 *AdCCSI* 的表达, 这可能与 *AdCCSI* 启动子区存在脱落酸应答元件 ABRE 和赤霉素应答元件 GARE-motif 有关, 但仍需进一步通过启动子元件缺失等方法进行验证。

综上所述, 猕猴桃 *AdCCSI* 具有植物 *CCS* 基因家族的基本特征, *AdCCSI* 在不同贮藏温度和激素处理下差异表达, 推测 *AdCCSI* 可能参与调控果实贮藏过程中 SOD 酶活性, 进而影响果实的衰老进程。

References

- Balandin X, Castresana C. 2002. *AtCOX17*, an *Arabidopsis* homolog of the yeast copper chaperone COX17. *Plant Physiology*, 129 (4): 1852 - 1857.
- Beauclair L, Yu A, Bouche N. 2010. MicroRNA-directed cleavage and translational repression of the copper chaperone for superoxide dismutase mRNA in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 62 (3): 454 - 462.
- Chen Jin-yin. 2004. Studies on mechanism of post-harvest ripening and its regulation in ‘Jin Kui’ kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) [Ph. D.

- Dissertation]. Changsha: Hunan Agricultural University. (in Chinese)
- 陈金印. 2004. 美味猕猴桃 ‘金魁’ 果实后熟软化机理及其调控技术研究[博士学位论文]. 长沙: 湖南农业大学.
- Chen Kun-song, Li Fang, Zhang Sang-long, Gavin S Ross. 1999. Role of abscisic acid and indole-3-acetic acid in kiwifruit ripening. *Acta Horticulturae Sinica*, 26 (2): 81 – 86. (in Chinese)
- 陈昆松, 李 方, 张上隆, Gavin S Ross. 1999. ABA 和 IAA 对猕猴桃果实成熟进程的调控. *园艺学报*, 26 (2): 81 – 86.
- Chen Yi-ting, Lai Rui-lian, Cheng Chun-zhen, Feng Xin, Qu Meng-meng, Liu Ping-yuan, Chen Wen-guang, Wu Ru-jian. 2017. Cloning and expression of polygalacturonase gene (*AcPG*) during fruit softening of kiwifruit (*Actinidia chinensis*). *Journal of Agricultural Biotechnology*, 25 (2): 205 – 213. (in Chinese)
- 陈义挺, 赖瑞联, 程春振, 冯 新, 屈蒙蒙, 刘萍元, 陈文光, 吴如健. 2017. 猕猴桃果实软化过程中 *AcPG* 基因的克隆与表达. *农业生物技术学报*, 25 (2): 205 – 213.
- Chu C C, Lee W C, Guo W Y, Pan S M, Chen L J, Li H M, Jinn T L. 2005. A copper chaperone for superoxide dismutase that confers three types of copper/zinc superoxide dismutase activity in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 139 (1): 425 – 436.
- Dai X, Zhao P X. 2011. psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. *Nucleic Acids Research*, 39 (suppl 2): W155 – W159.
- Feng X, Chen F, Liu W, Thu M K, Zhang Z, Chen Y, Cheng C, Lin Y, Wang T, Lai Z. 2016. Molecular characterization of *MaCCS*, a novel copper chaperone gene involved in abiotic and hormonal stress responses in *Musa acuminata* cv. Tianbaojiao. *International Journal of Molecular Sciences*, 17 (4): 441.
- Forman H J, Fridovich I. 1973. On the stability of bovine superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 248 (8): 2645 – 2649.
- Himelblau E, Mira H, Lin S J, Culotta V C, Pefiarmbia L, Amasino R M. 1998. Identification of a functional homolog of the yeast copper homeostasis gene *ATX1* from *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 117 (4): 1227 – 1234.
- Huang S, Ding J, Deng D, Tang W, Sun H, Liu D, Zhang L, Niu X, Zhang X, Meng M, Yu J, Liu J, Han Y, Shi W, Zhang D, Cao S, Wei Z, Cui Y, Xia Y, Zeng H, Bao K, Lin L, Min Y, Zhang H, Miao M, Tang X, Zhu Y, Sui Y, Li G, Sun H, Yue J, Sun J, Liu F, Zhou L, Lei L, Zheng X, Liu M, Huang L, Song J, Xu C, Li J, Ye K, Zhong S, Lu B, He G, Xiao F, Wang H, Zheng H, Fei Z, Liu Y. 2013. Draft genome of the kiwifruit *Actinidia chinensis*. *Nature Communications*, 4: 2640.
- Huang Wen-juan, Zhong Cai-hong. 2017. Research advances in the postharvest physiology of kiwifruit. *Plant Science Journal*, 35 (4): 622 – 630. (in Chinese)
- 黄文俊, 钟彩虹. 2017. 猕猴桃果实采后生理研究进展. *植物科学学报*, 35 (4): 622 – 630.
- Kim B E, Nevitt T, Thiele D J. 2008. Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nature Chemical Biology*, 4 (3): 176 – 185.
- Kongsuwan A, Takanori S, Katsuya O, Hitoshi O, Satoru K. 2017. Effects of ethephon and abscisic acid application on ripening-related genes in ‘Kohi’ kiwifruit (*Actinidia chinensis*) on the vine. *Horticultural Plant Journal*, 3 (1): 29 – 33.
- Lamb A L, Torres A S, O'Halloran T V, Rosenzweig A C. 2001. Heterodimeric structure of superoxide dismutase in complex with its metallochaperone. *Nature Structural Biology*, 8 (9): 751 – 755.
- Li Hua, Liang Chunqiang, Lü Jiang, Hu Miao, Li Jiaying, Rao Jingping. 2017. Effects of oxalic acid treatment on lignification and related enzymes activities in ‘Huayou’ kiwifruit during cold storage. *Acta Horticulturae Sinica*, 44 (6): 1085 – 1093. (in Chinese)
- 李 桦, 梁春强, 吕 苙, 胡 苗, 李佳颖, 饶景萍. 2017. 草酸对冷藏 ‘华优’ 猕猴桃果实木质化及相关酶活性的影响. *园艺学报*, 44 (6): 1085 – 1093.
- Liang Chunqiang, Lü Jiang, Jin Mijing, Li Hua, Rao Jingping. 2017. Effects of oxalic acid treatment on chilling injury, antioxidant capacity and energy status in harvested kiwifruits under low temperature stress. *Acta Horticulturae Sinica*, 44 (2): 279 – 287. (in Chinese)
- 梁春强, 吕 苙, 靳蜜静, 李 桦, 饶景萍. 2017. 草酸处理对采后猕猴桃冷害、抗氧化能力及能荷的影响. *园艺学报*, 44 (2): 279 – 287.
- Lin Yu-ling, Lai Zhong-xiong. 2012. Cloning of copper chaperone for superoxide dismutase gene *CCS* from embryogenic callus of *Dimocarpus longan* Lour. and its expression analysis during somatic embryogenesis. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 18 (3): 351 – 358. (in Chinese)
- 林玉玲, 赖钟雄. 2012. 龙眼胚性愈伤组织 Cu/Zn-SOD 分子伴侣 *CCS* 的克隆及其在体胚发生过程. *应用与环境生物学报*, 18 (3): 351 – 358.

- Lü Jun-liang, Chen Kun-song, Zhang Shang-long. 1993. Study on the change in ethylene production, the activity of superoxide dismutase and peroxidase in Chinese gooseberry fruits during ripening. *Journal of Zhejiang Agricultural University*, 19 (2): 135 – 138. (in Chinese)
- 吕均良, 陈昆松, 张上隆. 1993. 猕猴桃果实后熟过程中乙烯生成和超氧化物歧化酶及过氧化物酶的活性变化. *浙江农业大学学报*, 19 (2): 135 – 138.
- Molina-Rueda J J, Tsai C J, Kirby E G. 2013. The populus superoxide dismutase gene family and its responses to drought stress in transgenic poplar overexpressing a pine cytosolic glutamine synthetase (*GS1a*). *PLoS ONE*, 8 (2): pone.0056421.
- Nie Li-na, Xia Lan-qin, Xu Zhao-shi, Gao Dong-yao, Li Lin, Yu Zhuo, Chen Ming, Li Lian-cheng, Ma You-zhi. 2008. Progress on cloning and functional study of plant gene promoters. *Journal of Plant Genetic Resources*, 9 (3): 385 – 391. (in Chinese)
- 聂丽娜, 夏兰琴, 徐兆师, 高东尧, 李琳, 于卓, 陈明, 李连城, 马有志. 2008. 植物基因启动子的克隆及其功能研究进展. *植物遗传资源学报*, 9 (3): 385 – 391.
- Rae T, Schmidt P, Pufahl R, Culotta V, O'halloran T. 1999. Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science*, 284 (5415): 805 – 808.
- Ravet K, Pilon M. 2012. Copper and iron homeostasis in plants: the challenges of oxidative stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19 (9): 919 – 932.
- Sagasti S, Bernal M, Sancho D, del Castillo M B, Picorel R. 2014. Regulation of the chloroplastic copper chaperone (CCS) and cupro zinc superoxide dismutase (CSD2) by alternative splicing and copper excess in *Glycine max*. *Functional Plant Biology*, 41 (2): 144 – 155.
- Sagasti S, Yruela I, Bernal M, Lujan M A, Frago S, Medina M, Picorel R. 2011. Characterization of the recombinant copper chaperone (CCS) from the plant *Glycine (G.) max*. *Metallomics*, 3 (2): 169 – 175.
- Schmidt P J, Kunst C, Culotta V C. 2000. Copper activation of superoxide dismutase 1 (SOD1) *in vivo*: role for protein-protein interactions with the copper chaperone for SOD1. *The Journal of Biological Chemistry*, 275 (43): 33771 – 33776.
- Stewart C N Jr, Via L E. 1993. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *Biotechniques*, 14 (5): 748 – 750.
- Trindade L M, Horvath B M, Bergervoet M J E, Visser R G F. 2003. Isolation of a gene encoding a copper chaperone for the copper/zinc superoxide dismutase and characterization of its promoter in potato. *Plant Physiology*, 133 (2): 618 – 629.
- Wei C, Yang H, Wang S, Zhao J, Liu C, Gao L, Xia E, Lu Y, Tai Y, She G, Sun J, Cao H, Tong W, Gao Q, Li Y, Deng W, Jiang X, Wang W, Chen Q, Zhang S, Li H, Wu J, Wang P, Li P, Shi C, Zheng F, Jian J, Huang B, Shan D, Shi M, Fang C, Yue Y, Li F, Li D, Wei S, Han B, Jiang C, Yin Y, Xia T, Zhang Z, Bennetzen J L, Zhao S, Wan X. 2018. Draft genome sequence of *Camellia sinensis* var. *sinensis* provide insights into the evolution of the tea genome and tea quality. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, Doi: 10.1073/pnas.1719622115.
- Yao Jie, Zhao Yan-ling. 2014. Molecular regulation mechanism research progress on plant Cu, Zn-SOD. *Chinese Journal of Tropical Agriculture*, 34 (3): 55 – 60. (in Chinese)
- 姚婕, 赵艳玲. 2014. 植物 Cu, Zn-SOD 分子调控机理研究进展. *热带农业科学*, 34 (3): 55 – 60.
- Zhang Hui-qin, Xie Ming, Xiao Jin-ping, Zhou Li-qiu, Song Gen-hua. 2015. Screening of reference genes for real-time quantitative PCR in kiwifruit. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 27 (4): 567 – 573. (in Chinese)
- 张慧琴, 谢鸣, 肖金平, 周利秋, 宋根华. 2015. 猕猴桃实时荧光定量 PCR 分析中内参基因的筛选. *浙江农业学报*, 27 (4): 567 – 573.
- Zhang Mei-fang, He Ling, Zhang Mei-li, Guo Yu-huan. 2014. Advances in preservation methods for kiwifruit. *Food Science*, 35 (11): 343 – 347. (in Chinese)
- 张美芳, 何玲, 张美丽, 郭宇欢. 2014. 猕猴桃鲜果贮藏保鲜研究进展. *食品科学*, 35 (11): 343 – 347.
- Zhao Yan-lin, Yao Jie. 2017. Cloning and expression of copper chaperone for superoxide dismutase gene in *Eucalyptus grandis* × *E. ophylla*. *Journal of Huaqiao University (Natural Science)*, 38 (3): 374 – 378. (in Chinese)
- 赵艳玲, 姚婕. 2017. 巨尾桉铜分子伴侣 *EuCCS* 基因的克隆及表达分析. *华侨大学学报 (自然科学版)*, 38 (3): 374 – 378.
- Zhu H, Shipp E, Sanchez R J, Liba A, Stine J E, Hart P J, Gralla E B, Nersissian A M, Valentine J S. 2000. Cobalt(2+) binding to human and tomato copper chaperone for superoxide dismutase: implications for the metal ion transfer mechanism. *Biochemistry*, 39 (18): 5413 – 5421.