

# 油茶 FBPase 基因的全长 cDNA 克隆及序列分析

谭晓风, 曹彦妮, 郭静怡, 刘 凯

(中南林业科技大学 经济林育种与栽培国家林业局重点实验室, 湖南 长沙 410004)

**摘要:**FBPase 是调控 Calvin 循环的关键酶之一, 加速 Calvin 循环有利于提高植物的光合效率。在油茶 cDNA 文库和 EST 文库构建的基础上, 以油茶“湘林 1 号”的近成熟种子为材料, 采用 5' RACE 和 3' RACE 技术克隆油茶 FBPase 基因的全长 cDNA 序列; 该基因全长 cDNA 序列为 1 356 bp, 其中开放读码框为 1 020 bp, 多序列比对发现其与毛果杨的亲缘关系最近, 相似性为 84%; 该基因共编码 339 个氨基酸, 其蛋白质属稳定蛋白质, 等电点为 5.54, 不含二硫键, 为胞质 FBPase, 将该基因命名为 *co-fbp*。油茶 FBPase 基因的克隆对于进一步研究油茶光合作用、提高油茶光能利用率、提高油茶产量具有重要的意义。

**关键词:**油茶; FBPase 基因; 基因克隆; 全长 cDNA; 序列分析

中图分类号: S794.404 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2011)03-0514-07

## Cloning and Sequence Analysis of FBPase Gene from *Camellia oleifera*

TAN Xiao-feng, CAO Yan-ni, GUO Jing-yi, LIU Kai

(The Key Lab of Non Wood Forest Products of Forestry Ministry, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China)

**Abstract:** FBPase is one of the key enzymes controlling Calvin Cycle, which helps to improve Calvin circulation to accelerate photosynthetic efficiency of plants. The full length cDNA of FBPase gene was separated from the EST library and the cDNA library of *Camellia oleifera* by the method of 5' RACE and 3' RACE. The results showed that this gene is 1 356 bp in length, and it has an open reading frame of 1 020 bp, and the alignment of nucleotide acids sequence reveals that the comparability of *Camellia oleifera* and *populus trichocarpa* is 84%. This gene encodes 339 aminoacids, the protein is a stable protein whose Isoelectric point is 5.54. *Camellia oleifera* FBPase encoded protein does not contain disulfide, thus the gene is c-FBPase named *co-fbp*. This study is significant help to the research on the photosynthesis of *Camellia oleifera*, increaseing energy efficiency and production.

**Key words:** *Camellia oleifera*; FBPase gene; gene cloning; full-length cDNA; sequence analysis

油茶(*Camellia oleifera*)为山茶科山茶属中种子含油脂较高的一类植物,广泛分布于我国南方<sup>[1]</sup>种仁含油率约为 55%,具有较高的经济和生态价值<sup>[2]</sup>,是我国重要的油料树种<sup>[3]</sup>。果糖-1,6-二磷酸(fructose-1,6-bisphosphatase, FBPase)是光合作用暗反应中非常重要的一个酶,它调控 Calvin 循环中的  $PO_4^{3-}$  循环,将果糖-1,6-二磷酸(fructose 1,6-bisphosphate, FBP)水解成果糖-6-磷酸和无机磷酸,该反应是不可逆的。与同反应中的其他酶相比,FBPase 的含量是极微弱的,也是极重要的。FBPase

收稿日期:2010-11-11 修回日期:2011-03-22

基金项目:国家自然科学基金项目(31070603)

作者简介:谭晓风(1956—)男,教授,主要从事经济林栽培育种与林业生物技术研究, E-mail: tanxiaofeng@126.com。

的活性与其底物浓度的关系很复杂<sup>[4]</sup>,受到果糖-2,6-二磷酸酶的抑制<sup>[5-7]</sup>。如果通过转基因技术使 FBPAse 的酶量得到提高,则 FBPAse 基因在植株能通过表达,从而加速 Calvin 循环,提高光合效率<sup>[8]</sup>,同时在一定程度上提高油茶产量。Calvin 循环中的 FBPAse 在决定碳元素到最终产物的分配上有着重要的意义,目前在油茶中还未有过关于 FBPAse 基因的相关研究报道,在本实验室所构建的油茶 EST 文库<sup>[9]</sup>和油茶相关基因克隆<sup>[10-12]</sup>的基础上,采用 5'RACE 和 3'RACE 技术对油茶 FBPAse 基因的全长 cDNA 进行克隆,以研究油茶 FBPAse 基因对油茶光合效率和油茶产量的影响。同时利用软件对基因全长和编码蛋白进行序列分析、分子进化研究,为以后调控油茶 FBPAse 基因的表达模式以最终提高油茶产量打下坚实基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验所用材料为油茶优良无性系“湘林1号”的近成熟种子,采自于株洲市马家河乡中南林业科技大学经济林育种与栽培国家林业局重点实验室种质资源库,洗净后于-75℃超低温冰箱保存备用。油茶近成熟种子的 cDNA 文库已在本实验室前期研究中构建好。

### 1.2 方法

1.2.1 油茶 cDNA 文库中 FBPAse 基因的分离克隆及序列分析 从本实验室构建的油茶 cDNA 文库中挑取 FBPAse 基因的单克隆,用灭菌的牙签在含有 1.5 g/L 的 Amp 的 LB 固体培养基表面划线,置于 37℃ 恒温培养箱中倒置培养 12~14 h。活化后挑取单菌落于含有相同 Amp 浓度的 5 mL 液体 LB 培养基中,37℃ 200 r/min 过夜培养 10~16 h,培养至 OD 值为 0.6,然后以菌液为模板 PCR 进行 T3、T7 测序,将阳性结果的菌液封装在 1.5 mL 离心管,送至华大基因测序。将测序结果在网上与其他物种的 FBPAse 基因的完整 cDNA 序列进行比对,分析其 5'端和 3'端缺少的部分。

1.2.2 油茶种子的总 RNA 提取及反转录 迅速从超低温冰箱取出“湘林1号”油茶果实,在液氮中研磨种仁至匀质粉末状,装入预冷的 1.5 mL 离心管中,用 Total RNA Purification System 提取油茶种子的总 RNA。提取总 RNA 后,用无 RNase 的 DNaseI 处理油茶总 RNA,以确保无 DNA 的污染。采用 Fermentas 公司的 mRNA 反转录试剂盒,将提取的总 RNA 反转录成单链 cDNA。

1.2.3 油茶 FBPAse 基因的 RACE 扩增 根据文库中 FBPAse 基因的测序结果,设计 3 个 5'RACE 特异引物和 3 个 3'RACE 特异引物,分别为:5'GSP1: 5'-TTGCCTCCTCATCCTCTT-3';5'GSP2: 5'-TTG-GTTTCGCCAGCAAGTCC-3';5'GSP3: 5'-GCAAGACCCGCTTGTGACAG-3';3'SP1: 5'-AACTCATT-GGACTTGCTG-3';3'SP2: 5'-ACGGGTCCTCTAACATTGAT-3';3'SP3: 5'-AGAATATGCTGGCTGCTG-GATA-3'。采用 Invitrogen 的 5'RACE System Rapid Amplification of cDNA Ends 和 3'RACE System Rapid Amplification of cDNA Ends 试剂盒分别进行 RACE,该试剂盒反转录时用的是特异引物(5'GSP1 和 3'SP1),能更准确的与目的基因相结合,从而大大提高目的基因的特异性和产量。以 RACE 反转录得到的单链 cDNA 为模板,5'GSP2/3'SP2 和 5'GSP3/3'SP3 为引物进行巢式扩增。电泳检测巢式 PCR 结果,回收目的条带,连接、转化后,将阳性结果的菌液送测序。

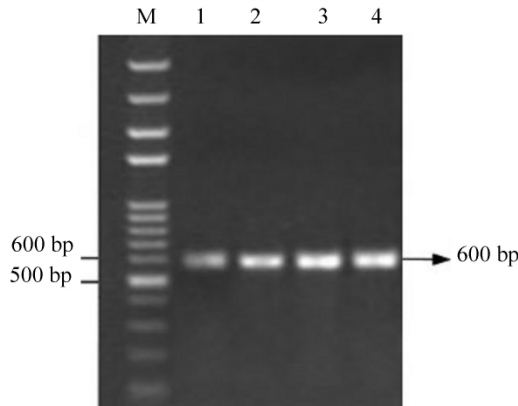
FBPAse 基因的 5'RACE 和 3'RACE 初次 PCR 反应体系(50 μL)为:10×PCR buffer(with Mg<sup>2+</sup>) 5 μL、dNTP(2.5 mmol/L) 4 μL、AAP 和 5'GSP2(10 μmol/L)或 AUAP 和 3'SP2 各 2 μL、Taq 酶 0.25 μL、cDNA template 2 μL、加 ddH<sub>2</sub>O 至 50 μL。

FBPAse 基因的 5'RACE 和 3'RACE 巢式 PCR 反应体系(50 μL)为:10×PCR buffer(with Mg<sup>2+</sup>) 5 μL、dNTP(2.5 mmol/L) 4 μL、AUAP(10 μmol/L)和巢式扩增引物(5'GSP3 或 3'SP3)各 2 μL、Taq 酶 0.25 μL、F5'GSP2-PCR 产物或 F3'SP2-PCR 产物 2 μL、加 ddH<sub>2</sub>O 至 50 μL。

PCR 反应程序:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 40 s,65,60,58,56℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 90 s,每个退火温度各循环 5 次;94℃ 变性 40 s,55℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 90 s 再进行 20 个循环;最后 72℃ 延伸 6 min,4℃ 保存。

1.2.4 油茶 FBPAse 基因的 cDNA 全长克隆及序列特征分析 将一系列巢式扩增获得的油茶 FBPAse 基因片段与文库克隆得到的片段利用软件拼接,得到了理论上的油茶 FBPAse 基因的 cDNA 拼接全长序

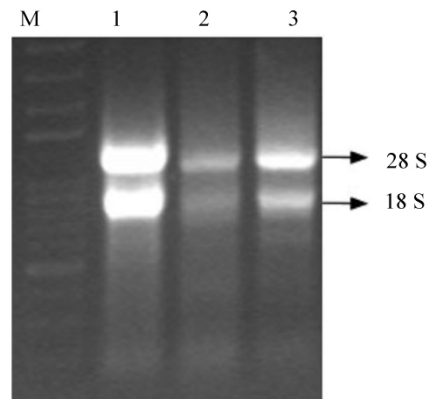
列。用 NCBI - ORF Finder 软件( <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/project/golf.html> ) 分析出理论上的油茶 FBPase 基因的开放读码框 在起始密码子 ATG 的 5' 方向设计正向引物 F1: 5' - GGATCACGCAGCGGAT-GCTCTGAGGAC - 3'; 在终止密码子 TAA 的 3' 方向设计反向引物 R1: 5' - GCAGTCACATGTTACTTGT-TCTCTT - 3'。以反转录 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 从而得到油茶 FBPase 基因的 cDNA 全长。并借助 Vector NTI 对 FBPase 基因进行比对 在线分析其同源性 利用 ANThERPO 软件预测其蛋白质性质。



M: 1 000 bp DL; 1 ~4: 油茶 FBPase 基因的单克隆重组子。  
M: 1 000 bp DL; 1 ~4: monoclonal recombinant of *Camellia oleifera* FBPase gene fragment.

图 1 重组子 PCR 检测

Fig. 1 Test of recombinant by PCR



M: 1 000 bp DL; 1 ~3: 总 RNA。  
M: 1 000 bp DL; 1 -3: total RNA.

图 2 总 RNA 电泳图

Fig. 2 Electrophoresis figure of total RNA

## 2 结果与分析

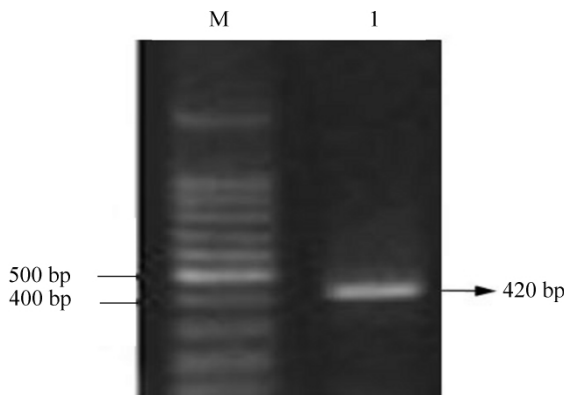
### 2.1 油茶 FBPase 基因 EST 重组子的 PCR 检测及测序结果

以油茶 cDNA 文库中的油茶 FBPase 基因的克隆培养菌液为模板, 以 1 对通用引物( T3、T7) 进行 PCR 扩增。电泳检测后在自动凝胶成像系统中观察并照相, 右侧泳道中的阳性克隆, 大小 600 bp 左右 ( 图 1) 。

将此重组子的测序结果在网上 BLAST 比对分析, 与其他物种的 FBPase 基因相似, 其相似性达到了 80% 以上, 由此确认所得片段为油茶 FBPase 基因片段, 但 3' 端有缺失 5' 端有待验证。

### 2.2 油茶种子总 RNA 的提取结果

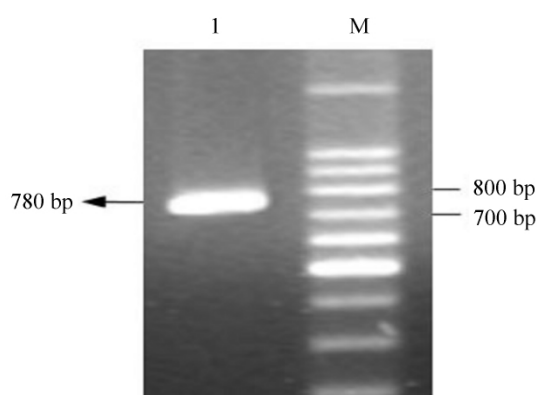
油茶种子总 RNA 提取后, 为防止降解, 在 DEPC 处理水配制 TAE 缓冲液中快速检测 RNA 的质量。如图 2 第 3 泳道, 电泳条带清晰明亮 28S: 18S 基本处于 2:1 状态, 符合反转录和 RACE 的实验要求。



M: 1 000 bp DL; 1: 5'RACE。

图 3 油茶 FBPase 基因的 5'RACE PCR 扩增

Fig. 3 5'RACE of *C. oleifera* FBPase gene



1: 3'RACE; M: 1 000 bp DL。

图 4 油茶 FBPase 基因的 3'RACE 扩增

Fig. 4 3'RACE of *C. oleifera* FBPase gene

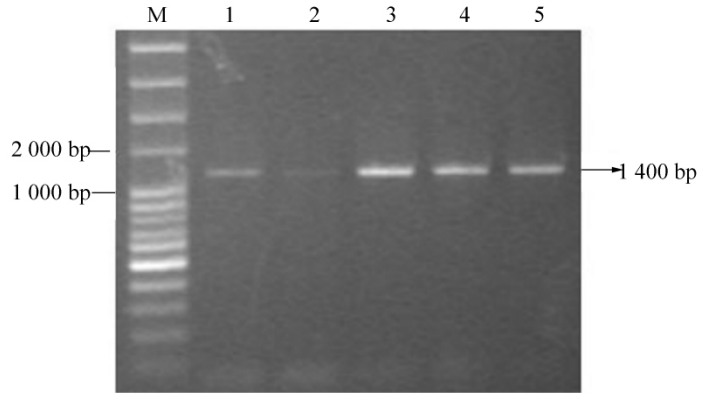
### 2.3 FBPase 基因的 5'RACE 与 3'RACE

FBPase 基因的 5'RACE 初次 PCR 电泳检测有两个不同大小条带,经巢式 PCR 电泳检测有一条带十分明亮,无杂带,约 420 bp(图 3)。回收该条带,连接转化后对菌液进行检测,将一个阳性克隆送测序。将测序结果在网上 BLAST 比对分析,与毛果杨和蓖麻等植物的油茶 FBPase 基因均能从其他物种的第 1 个碱基开始比对上,由此推测 5'RACE 已扩出油茶 FBPase 基因 5'端的完整序列。

从图 4 可以看出,油茶 FBPase 基因的 3'RACE 扩增产物大约 780 bp,条带清晰明亮,无杂带。回收该条带,连接转化后对菌液进行检测,将阳性克隆送测序。将测序结果与重组子序列用 Vector NTI 软件比对,重组子的 3'端与油茶 3'RACE 扩增结果的 5'端完全吻合,且测序结果包含多聚 A 序列,由此可以推测油茶 FBPase 基因的 3'RACE 产物序列包含了油茶 FBPase 基因的 3'端的编码区和 3'端 UTR。

### 2.4 油茶 FBPase 基因的全长 cDNA 扩增及序列分析

以反转录 cDNA 为模板,设计一对两端引物扩增出油茶 FBPase 的基因序列(图 5),该片段长约 1 400 bp。将测序结果在线结合其他物种 FBPase 基因序列进行比对,与其他物种 FBPase 基因相似性大于 80%,与毛果杨(*Populus trichocarpa*)的同源性高达 84%,与黄萼(*Flaveria linearis*)的为 82%,与豌豆(*Pisum sativum*)的为 81%,与野芭蕉(*Musa acuminata*)的为 80%。从而推测获得的序列即为油茶 FBPase 基因的全长 cDNA 序列(图 6),命名为 *co-fbp*。



M: 1 000 bp DL; 1 - 5: 全长 cDNA。

M: 1 000 bp DL; 1 - 5: full cDNA。

图 5 油茶 FBPase 基因全长 cDNA 的 PCR 扩增结果

Fig. 5 PCR result of cDNA cloning from *C. oleifera* FBPase gene

与野芭蕉(*Musa acuminata*)的为 80%。从而推测获得的序列即为油茶 FBPase 基因的全长 cDNA 序列(图 6),命名为 *co-fbp*。

```

1   ATTCAGAACT  TGGTCTAGTC  GGAG ATG GAT  CACGCAGCGG  ATGCTCTGAG  GACCGATTTC  ATGACGATAA  CTCGGTTCGT  GCTGAACCAG  CAGTCGAACT
101  ACCCGGAGTC  ACGCGGGCAC  TTCACCATCT  TGCTCAGTCA  CATTTGTTCT  GGTTCGCAAGT  TCGTTTGCTC  TTCTGTCAAC  AAGCGCGGTC  TTGCTAAACT
201  CATTGGACTT  GCTGGCGAAA  CCAACGTGCA  GGGTGAAGAG  CAAAAGAAAC  TAGATGTGCT  TTCAAATGAA  GTTTTCGTCA  AGGCCTGGT  CAGCAGTGGC
301  CGAACATCCA  TCCTTGTCTC  TGAAGAGGAT  GAGGAGGCCA  TATTTGTGCA  GGCACCCAAG  CGTGGGAGGT  ACTGTGTCTG  TTTTGATCCA  CTAGACGGGT
401  CCTCTAACAT  TGATTTGTTT  GTTTCCATTG  GAACGATCTT  TGGGATTAT  ATGTGAAAG  ATGGTGGAGA  ACCAACTTTA  GATGAGGTGC  TGCAACCTGG
501  AAAGAATATG  CTGGCTGCTG  GATATTGCAT  GTATGGAAGC  TCTTGCACGT  TTCTGTAAAG  CACTGGAGAG  GCTGTAAATG  GATTTACTCT  TGATCCATCT
601  CTTGGGGAGT  TTATACTCAC  TCATCCAGAC  ATTAAGATTG  CTAAAAAAGG  AAAGATCTAC  TCAGTAAATG  AAGGAAAATG  CAAGAATTGG  GATGGTCCAA
701  CAACTAAGTA  TGTGAAAA  TGCAAGTTCG  CTACGGATGG  ATCATCATCA  AAGTCTCTAA  GATACATTTG  AAGCATGGTG  GCTGATGTCC  ATCGGACGTT
801  ACTTTATGGT  GGTATCTTTT  TGTACCCTGC  TGATAAGAAA  AGCCCAGTGG  GAAAACCTGAG  GGTTTTTTAT  GAAGTTTTTC  CAATGTCAAT  CGTGATGGAA
901  CAAGTGGAG  GTCAGGCATT  TACGGGCAAG  CAACGGGCAC  TTGACTTGGT  TCCAAAGAAG  ATACACGAGC  GATTCTCTAT  ATTCATGGGT  AGTTATGATG
1001  ATGTTGAGGA  TGTCAAACCC  CTTTATGTTG  TTGAAGAGAA  CAAG TAA CAT  GTGACTGCAT  TTCCATTTGG  TGCTTGTGCA  GAGGATGTGG  GGGATATTTT
1101  AGTGTTTCAA  CTTGCTAACT  TATTATTTTT  TTTTATTTAA  AAAGTCAAAA  CCCTCTGAT  TTCTCTTCTA  ATTGAATAAT  ACAATTATTC  ATGGAATTTT
1201  GGGGATGATG  ATTCATGTT  TTTTGATTAT  AGCTGATGAG  TGAATGTTTG  CAATGAACAA  AAGAATTCAA  GCATAACAT  GACCATGTGC  ATAACCTGAC
1301  ATGAAAACAT  TATAATTTTC  TT AAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA

```

编码序列: 25 ~ 1 044 bp; 方框分别为起始和终止密码子,下划线为 Poly 尾巴。

Coding sequence: 25 ~ 1 055 bp; Boxes are the start and stop codons respectively, underscores are Poly tail.

图 6 油茶 FBPase 基因的全长 cDNA

Fig. 6 Full-length cDNA sequence of *C. oleifera* FBPase gene

### 2.5 FBPase 蛋白质序列分析及理化性质分析

油茶 FBPase 基因的完整 CDS(25 ~ 1 044 bp) 编码 339 个氨基酸,与 genebank 中已注册的其他物种 FBPase 的蛋白质序列比较,如图 7。单子叶植物(水稻)与双子叶植物的 FBPase 基因之间差异并不大,不同来源的 FBPase 基因具有很高的相似性,中间区和 C 端的保守性都较强,N 端的保守性相对较弱。

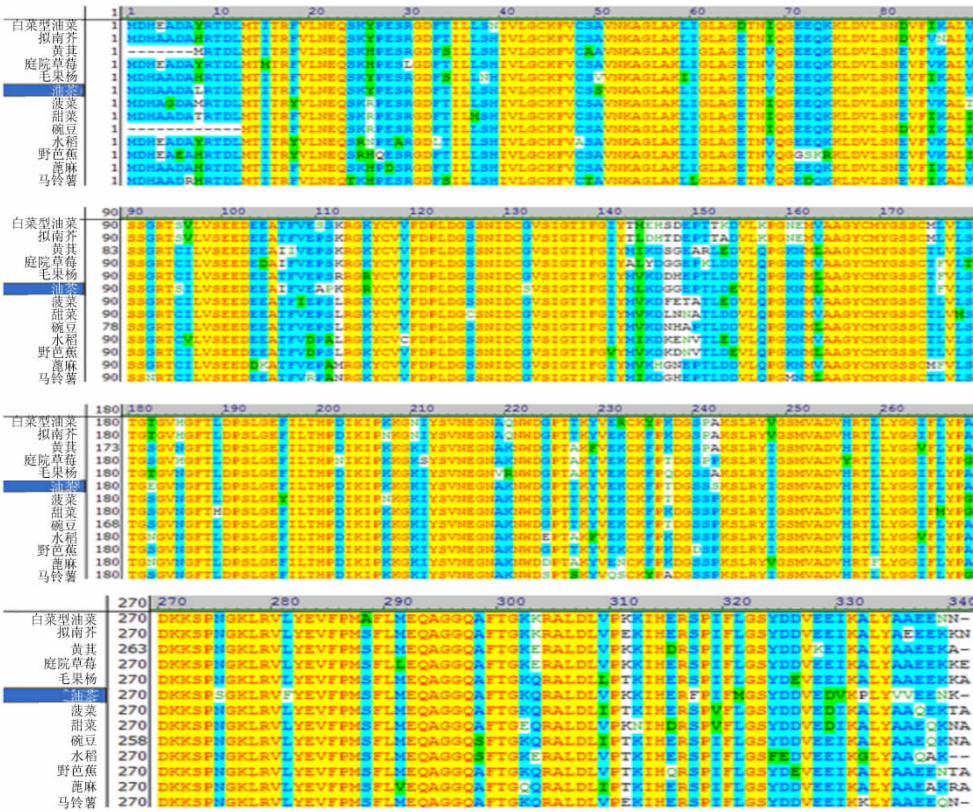


图 7 油茶与其他物种的 FBpase 蛋白质的序列比对

Fig. 7 Alignment of FBpase protein sequences of *C. oleifera* and other plants

将图 7 中不同物种的 FBpase 基因进行比对,得出它们的亲缘进化关系(图 8)。油茶与毛果杨等亲缘关系较近,在氨基酸序列和保守元件上极为相似。

利用生物学软件 ANTHEPROT 对 FBpase 的理化性质进行分析,其蛋白分子量为 37.7 kD,理论等电点为 5.54,其中负电荷氨基酸残基数目为 44,正电荷氨基酸残基数目为 38。油茶 FBpase 蛋白质属于稳定蛋白质,不稳定系数为 39.47。对其疏水性和跨膜区域进行了分析预测,结果如图 9 和图 10,油茶 FBpase 蛋白各位置的疏水指数从 -2.600 到 2.244,一般来说,蛋白质的疏水性与跨膜区是相互统一的。



图 8 油茶与其他物种 FBpase 的亲缘进化关系

Fig. 8 Phylogenetic tree based on FBpase of *C. oleifera* and other species

其中图 9 横坐标为编码蛋白的氨基酸序列,纵坐标为亲、疏水值(“-”表示亲水性,“+”表示疏水性)。FBpase 蛋白的调控机制之一,即光驱动的电子传递使基质中铁氧还蛋白被还原,进而使硫氧还蛋白被还原,最终使 FBpase 相邻的半胱氨酸上的二硫键打开变成 2 个巯基,FBpase 酶被活化。通过蛋白质结构在线分析(<http://www.ics.uci.edu/~baldig/scratch/>)此次得到的油茶 FBpase 基因的编码蛋白不含二硫键,证明此油茶 FBpase 基因不受光调控,推测其为胞质 FBpase,其活性被 AMP 所抑制,不受光调控,最佳活性的 pH 为 8.0<sup>[13]</sup>。



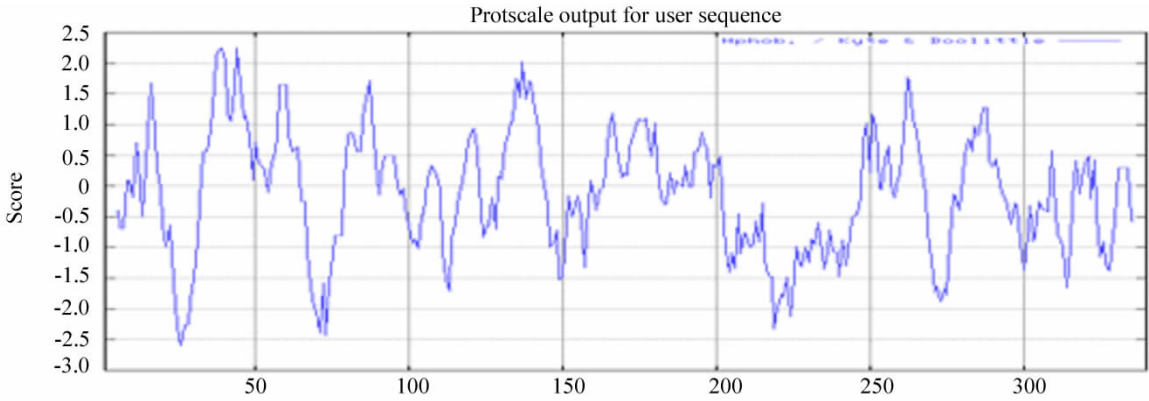


图 9 油茶 FBPase 蛋白质疏水性分析

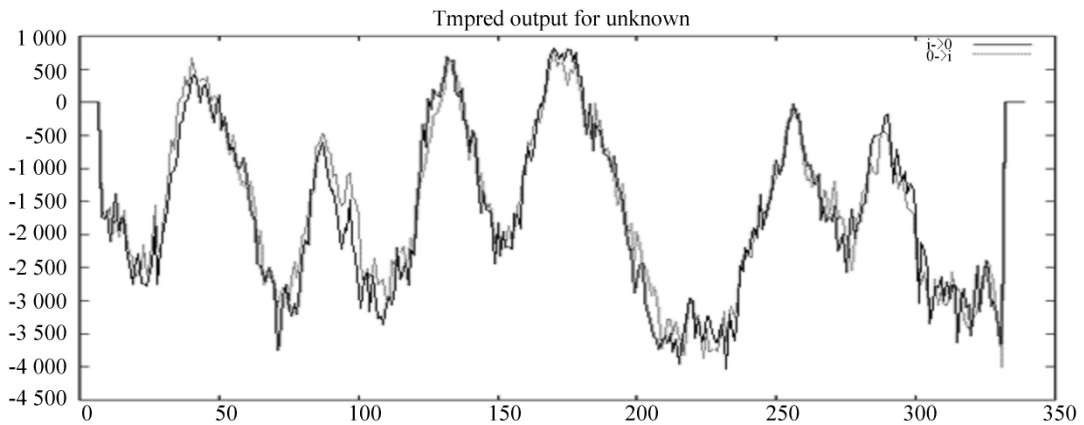
Fig. 9 Hydrophobicity profile of *C. oleifera* FBPase protein

图 10 油茶 FBPase 蛋白跨膜区预测结果

Fig. 10 Result of prediction on *C. oleifera* FBPase protein

### 3 结论与讨论

本试验在构建的油茶 cDNA 文库和 EST 文库的基础上,采用 5'RACE 和 3'RACE 技术分别得到了油茶 FBPase 基因的 5'端和 3'端,然后在其两边 UTR 设计引物扩增首次克隆到了油茶 FBPase 基因的 cDNA 全长。该基因全长 1 356 bp,编码区 1 020 bp,编码 339 个氨基酸,起始密码子为 ATG,终止密码子为 TAA,是一个完整的 CDS。通过比对和构建亲缘进化关系发现油茶 FBPase 基因与其他物种的 FB-Pase 基因的相似性较高,其中与毛果杨的亲缘关系最为接近,可能为相同进化始祖。

高等植物的 FBPase 有两种,分别存在与叶绿体(cp-FBPase)和胞质(c-FBPase),经比对分析本试验获得的基因为 c-FBPase,命名为 *co-fbp*。该酶不受光调控,是糖异生中调控流动的一个控制点,其活性被 AMP 所抑制,同时还受到果糖-2,6-二磷酸的强烈变构抑制<sup>[13]</sup>。Scala 等<sup>[14]</sup>对蓖麻子胚乳中 FBPase 进行了部分纯化;Kelly 等<sup>[15]</sup>对菠菜的 cp-FBPase 和 c-FBPase 均进行了完整的纯化;Raines 等<sup>[16-17]</sup>首次将小麦 FBPase 转入烟草,并对其表达进行探讨。Miyagawa 等<sup>[8]</sup>将蓝藻中 FBPase/景天庚酮糖-1,7-二磷酸酶转入烟草叶绿体中,首次研究出调控 FBPase 活性能显著提高烟草光合作用与糖类的积累,同时加速其生长。如今国内外对光合作用的调控已达到分子水平<sup>[18]</sup>,可从基因水平上对油茶光合作用进行调控,使其生成淀粉和蔗糖的能力提高,间接使油茶产量得到提高。本试验得到油茶 FBPase 基因的 cDNA 全长,还对其蛋白质理化性质进行分析和预测,为以后油茶 FBPase 基因的调控研究提供理论依据。今后将利用转基因技术对其表达进行改变,或改变其启动子以改变其表达模式,从而研究其对油茶光合作用的影响,进一步提高油茶产量。

参考文献:

[1] 中南林学院. 经济林栽培[M]. 北京: 中国林业出版社, 1983: 127-135.

- [2] 罗春清, 谭晓风, 漆龙霖. 山茶属植物分类综述 [J]. 中南林学院学报, 1999, 19(3): 78-81.
- [3] 邹峰, 谭晓风, 袁德义, 等. 我国油茶生殖生物学研究进展 [J]. 长江大学学报, 2009, 6(1): 18-26.
- [4] Schaftingen Van, Hers E. Inhibition of fructose - 1  $\beta$  - bisphosphatase by fructose - 2  $\beta$  - bisphosphate [J]. Biochem, 1981, 78(1): 2861-2863.
- [5] 王东, 杜喜玲. 玉米果糖 - 6 - 磷酸 2 - 激酶/果糖 - 2  $\beta$  - 二磷酸酶基因的全长 cDNA 克隆及表达 [J]. 遗传学报, 2003, 30(2): 163-168.
- [6] Stitt M. Fructose - 2  $\beta$  - bisphosphate as a regulatory molecule in plants [J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1990, 41(6): 153-185.
- [7] Stitt M, Cseke C, Buchana B B. Regulation of fructose - 2  $\beta$  - bisphosphate concentration in spinach leaves [J]. Eur J Biochem, 1984, 143(1): 89-93.
- [8] Miyagawa Y, Tamoi M, Shigeoka S. Overexpression of a cyanobacterial fructose - 1  $\beta$ /sedoheptulose - 1,7 - bisphosphatase bisphosphatase in tobacco enhances photosynthesis and growth [J]. Nat Biotechnol, 2001(19): 965-969.
- [9] 谭晓风, 胡芳名, 谢禄山, 等. 油茶种子 EST 文库构建及主要表达基因的分析 [J]. 林业科学, 2006, 42(1): 43-48.
- [10] 胡孝义, 谭晓风, 张党权, 等. 1 个油茶 Y<sub>2</sub>SK<sub>2</sub> 型脱水素的全长 cDNA 克隆及生理功能的预测 [J]. 林业科学, 2008, 44(10): 56-62.
- [11] 田晓明, 谭晓风, 胡孝义, 等. 油茶苯丙氨酸解氨酶基因的 cDNA 克隆与序列分析 [J]. 南京林业大学学报, 2009, 33(4): 24-28.
- [12] 谭晓风, 蒋瑶, 王保明, 等. 油茶乙酰辅酶 A 羧化酶 BC 亚基全长 cDNA 克隆及序列分析 [J]. 中南林业科技大学学报, 2010, 30(2): 1-9.
- [13] Nel W, Terblanche S E. Plant fructose - 1  $\beta$  - bisphosphatases: characteristics and properties [J]. Int J Biochem, 1992, 24(8): 1267-1280.
- [14] Scala j, Patrick C, Macheth G. Castor bean *FDPase* from endosperm tissue: properties and partial purification [J]. Life Sci, 1968, 7(8): 407-412.
- [15] Kelly G J, Zimmermann G, Latzko E. Fructose - bisphosphatase from spinach leaf chloroplast and cytoplasm [J]. Methods Enzymol, 1982, 90(2): 371-378.
- [16] Raines C A, Lloyd J C, Longstaff M, et al. Chloroplast fructose - 1  $\beta$  - Bisphosphatase: the product of a mosaic gene [J]. Nucleic Acid Res, 1988, 16(16): 7931-7942.
- [17] Lloyd J C, Raines C A, John U P, et al. The chloroplast *FBPase* gene of wheat: structure and expression of the promoter in photosynthetic and meristematic cells of transgenic tobacco plants [J]. Mol Gen Genet, 1991, 225(2): 209-216.
- [18] SI Li - zhen, WANG Li, CAO Shou - yun, et al. Deletion of 93bp far - upstream fragment of rice cytosolic fructose - 1  $\beta$  - bisphosphatase promoter completely alter its expression pattern [J]. Acta Botanica Sinica, 2002, 44(11): 1339-1345.