

doi:10.3969/j.issn.1672-5565.2013.03.09

橡胶草异戊烯焦磷酸异构酶基因的电子克隆及分析

仇 键,刘实忠,张志平,魏 芳,杨文凤,罗世巧,校现周*

(中国热带农业科学院橡胶研究所,农业部橡胶树生物学与遗传资源利用重点实验室,海南 儋州 571737)

摘要:利用电子克隆方法获得两条橡胶草异戊烯焦磷酸异构酶基因 (IDI) 的 cDNA 序列和编码区基因组序列,分别命名为 TkIDI1 和 TkIDI2,并采用生物信息学方法对该基因及其编码蛋白进行系统进化、亚细胞定位、活性位点、高级结构等方面的预测和分析。结果显示,TkIDI1 的 cDNA 序列长度为 980 bp,包含一个 696 bp 的开放读码框 (ORF),编码 232 个氨基酸,预测定位于内质网或叶绿体上;TkIDI2 的 cDNA 序列长度为 1 038 bp,包含一个 843 bp 的 ORF,编码 281 个氨基酸,预测定位于线粒体或叶绿体;而他们的截短转录本蛋白定位于胞质中,且都具有过氧化物酶体定位信号。结构分析表明 TkIDI1 和 TkIDI2 与植物 IDI 蛋白同源,活性位点保守,高级结构与其他植物的 IDI 均具有高度的相似性。

关键词:橡胶草;异戊烯焦磷酸异构酶;电子克隆;生物信息学分析

中图分类号:Q785 文献标识码:A 文章编号:1672-5565(2013)-03-209-07

In silicon cloning and bioinformatic analysis of isopentenyl diphosphate isomerase genes in *Taraxacum kok-saghyz*

QIU Jian, LIU Shi-zhong, ZHANG Zhi-ping,

WEI Fang, YANG Wen-feng, LOU Shi-qiao, XIAO Xian-zhou*

(Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Rubber Tree,

Ministry of Agriculture P. R. China; Rubber Research Institute, CATAS, Danzhou 571737, China)

Abstract: Two isopentenyl diphosphate isomerase genes (TkIDI1 and TkIDI2) were obtained successfully from *Taraxacum kok-saghyz* using in silicon cloning technique. Some characters of the IDI gene and encoded protein sequences were predicted and analyzed by the bioinformatics methods in the following aspects, such as phylogenetic tree, signal peptide, localization sites in cells, location of active sites, secondary and tertiary structure. Results showed that TkIDI1 (980 bp) contains a complete ORF (696 bp) encoding 232 amino acid and was predicted to locate at endoplasmic reticulum or chloroplast; TkIDI2 (1 038 bp) contains a complete ORF (843 bp) encoding 281 amino acid and was predicted to locate at mitochondrion or chloroplast; their truncated transcript productions were the cytoplasm located and presented PTS1 predicted as peroxisomal targeting. Protein structure prediction suggested that TkIDIs (TkIDI1 and TkIDI2) are highly homologous to other IDIs originate from various plants, and exhibit similar location of active sites and protein structure.

Keywords: *Taraxacum Kok-saghyz*; Isopentenyl Diphosphate Isomerase (IDI); In Silicon Cloning; Bioinformatics Analysis

橡胶草 (*Taraxacum kok-saghyz* Rodin) 又名俄罗斯蒲公英,属菊科蒲公英属大角蒲公英组,其多年生植株的根中天然橡胶含量高达 20% 左右,与巴西橡胶树、银胶菊并称为全球三大产胶植物^[1]。天然橡

胶是产胶植物乳管类萜代谢产物 (Isoprenoid),为类异戊二烯 C5 单元的长链高分子聚合物,目前广泛应用的巴西橡胶的聚合单元为 800 ~ 2 000 个类异戊二烯,橡胶草橡胶聚合长度略大^[1-2]。核磁共振

收稿日期:2012-11-02;修回日期:2012-11-26.

基金项目:国家天然橡胶产业体系 (CARS-34-GW7) 和中国热带农业科学院橡胶研究所基本科研业务费专项 (1630022011021) 资助。

作者简介:仇键,男,博士,研究方向:植物分子生物学;E-mail: qiu Jian_online@sina.com.

* 通讯作者:校现周,男,研究员,博士生导师,研究方向:橡胶树采胶生理;E-mail: xiaoxianzhou80@163.com.

分析表明异戊烯焦磷酸 (Isopentenyl diphosphate, IPP) 及其同分异构体二甲基烯丙基焦磷酸 (Dimethylallyl diphosphate, DMAPP) 是天然橡胶的生物合成的基本组成单元^[3-5], 在植物体内 DMAPP 是 IPP 的活化状态, 它失去一个无活性的磷酸基团后与 IPP 缩合成聚异戊烯链或其他次生代谢产物。Phillips 等人(2008)对异戊二烯合成途径研究发现, IPP 和 DMAPP 两者的摩尔比不同, 合成的萜类物质的种类也不同。当两者比例为 1: 1 时合成单萜类物质; 为 2: 1 时合成倍半萜或固醇类化合物; 为 3: 1 时合成二萜、类胡萝卜素、叶绿醇、聚戊烯醇或更长链的多萜类化合物^[6], 暗示 IPP 和 DMAPP 比值的调节是类异戊二烯聚合长度调控的重要因素之一。

异戊烯焦磷酸异构酶 (Isopentenyl diphosphate isomerase, IDI; EC 5.3.3.2) 可催化 IPP 和 DMAPP 之间可逆的转化, 是调节植物体内 IPP 和 DMAPP 的比值的关键酶^[7]。异戊烯焦磷酸异构酶几乎参与了所有类萜产物的生物合成, 被认识是类萜代谢的关键限速酶。目前已报道异戊二烯焦磷酸异构酶分为两类: I 型 IDI 发现较早, 存在于大多数物种中, 蛋白单体是一紧密的球形蛋白, 在二价阳离子作用下发挥功能; II 型 IDI 为近几年发现, 主要存在于一些革兰氏阳性菌、蓝藻和古生菌中, 为 TIM 桶状黄素蛋白, 不仅需阳离子, 还需 FMN 和 NAD(P)H 辅助^[8]。目前, 已有 50 余种植物的 IDI 基因被克隆, 如拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、烟草 (*Nicotiana tabacum*)、西红柿 (*Solanum lycopersicum*)、橡胶树 (*Hevea brasiliensis*)、长春花 (*Catharanthus roseus*) 等^[9-13]。

本研究以拟南芥 IDI 基因为探针, 搜索到多条橡胶草的 EST 序列, 在此基础上利用电子克隆方法识别获得了两条橡胶草 IDI 基因序列, 并对该基因及其编码蛋白进行了生物信息学分析, 将为 IDI 在长链天然橡胶生物合成中作用的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 橡胶草 IDI 基因的电子克隆, 开放阅读框的确定及基因功能预测

以拟南芥 IDI 基因 (AY065053) 为探针, 通过 BLASTN 程序搜索 GenBank 的橡胶草的 EST 数据库。利用 Vector NTI Suite 9 软件中的 Contig Express 程序对搜索到的与 AY065053 序列相似性较高的 EST 序列进行拼接。以新获得的序列重叠群为探针重复进行上述步骤, 直至不能获得延伸为止。用 ORF Finder 对拼接序列进行开放阅读框的查找和翻译, 并将该氨基酸序列应用 BLASTP 程序搜索 Gen-

Bank 的 Non-redundant protein sequences (nr) 数据库, 根据搜索到的同源蛋白序列的注释信息判定该 EST 重叠群编码产物的功能。

1.2 橡胶草 IDI 基因的 ORF 克隆和序列验证

采用 TRIzol 试剂提取橡胶草全株的总 RNA, 并按照反转录试剂盒 PrimeScript® RT reagent Kit (TaKaRa) 说明书合成 cDNA 第一链, 反转录产物保存于 -80℃ 备用。依据电子克隆的橡胶草 IDI 基因序列, 设计包含完整 ORF 的扩增引物 IDI1-F: 5'-tcctcctgcattagcttca-3', IDI1-R: 5'-tcacctgaaatggatggttaa-3' 以及 IDI2-F: 5'-aaccattgctaccatgatctc-3', IDI2-R: 5'-cacgtaaagaaaacaggaga-3', PCR 扩增片段经凝胶回收插入 pMD19-T 载体后, 转入大肠杆菌 DH5α 后测序。PCR 反应程序为: 95℃, 5 min; 95℃, 30s; 55℃, 30s; 72℃, 60s; 32 个循环; 72℃, 8min。

1.3 橡胶草 IDI 基因的基因组序列克隆和编码区基因结构分析

以 CTAB 法提取的橡胶草叶片基因组 DNA 为模板, 采用上述引物扩展相应的 IDI 基因的基因组序列, 将扩增片段经凝胶回收插入 pMD19-T 载体后, 转入大肠杆菌 DH5α 后测序。对 IDI 基因的 cDNA 序列和基因组序列进行多序列比对, 分析其编码区基因结构。

1.4 橡胶草 IDI 基因的生物信息学分析

核酸及氨基酸序列的同源性比对和多序列比对用 Blast 和 Clustal W 完成; 系统进化树采用 MEGA 5.0 软件 Neighbor-Joining 方法建立, 重复 1 000 次的自展 (Bootstrap) 检验计算各分支置信值。采用 PSORT, Predotar, MitoProt, ChloroP, TargetP 和 TargetSP-PTSI 在线程序对橡胶草 IDI 基因编码产物进行亚细胞定位分析; 蛋白质二级及三级结构的预测利用 SOPMA 和 SWISS-MODEL 在线工具完成。

2 结果分析

2.1 橡胶草 IDI 基因的 EST 检索和拼接

以拟南芥 IDI 基因的 cDNA 序列为探针, Blast 检索 NCBI 的橡胶草 EST 库, 获得 5 条与之高度同源的 EST 序列, 以检索到的 EST 为探针序列, 再次进行 blast 检索, 直到不能获得新的 EST 序列为止, 最终共检索到 13 条与拟南芥 IDI 基因高度同源的 EST 序列。对上述 13 条不同的 EST 进行拼接, 获得 2 个重叠群, 其中 10 个 EST 拼接成重叠群 congtig1, 长度 980 bp; 3 个 EST 拼接成重叠群 congtig2, 长度为 1 038 bp (见图 1)。

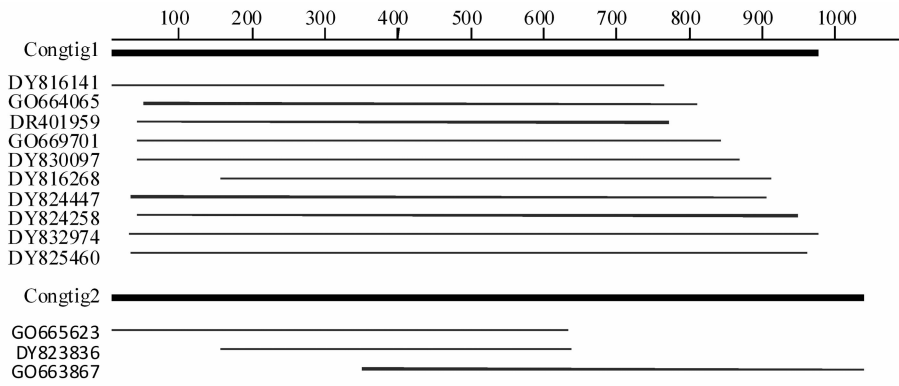


图1 橡胶草 IDI 基因的 EST 序列拼接示意图

Fig. 1 The joint map of TkIDIs EST sequence

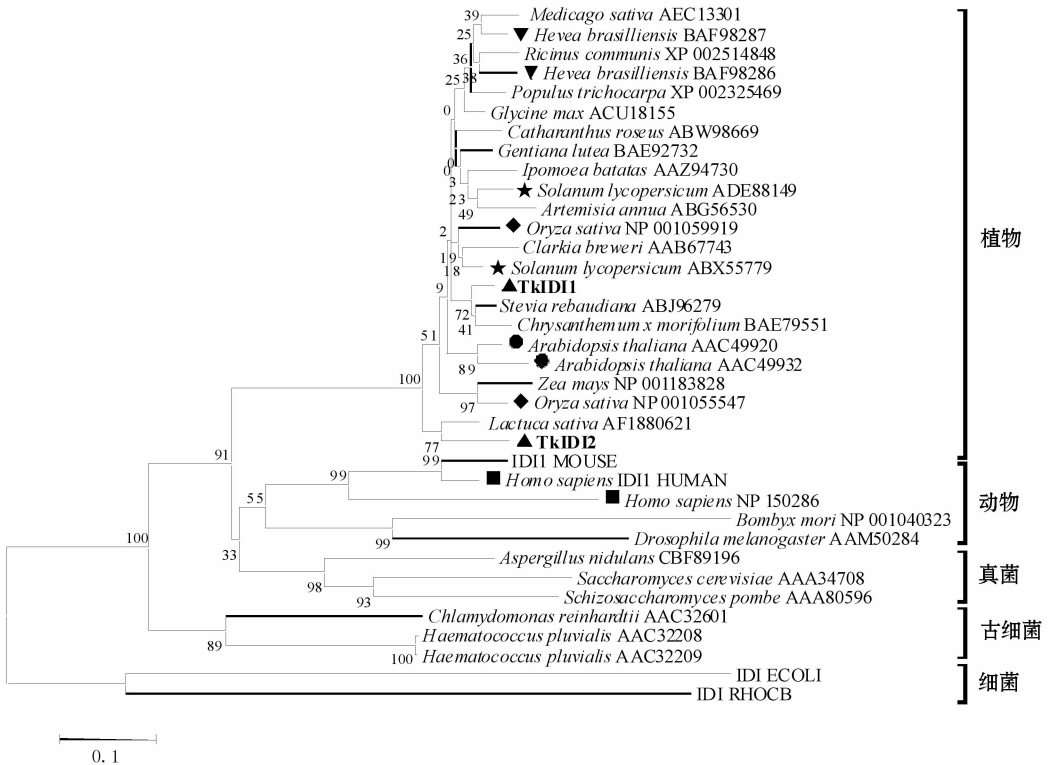


图2 不同类群的异戊烯焦磷酸异构酶的进化树分析

Fig.2 Phylogenetic tree of plant species based on amino acid sequences of IDI proteins

2.2 橡胶草 IDI 基因的 EST 重叠群的开放阅读框分析和序列验证

根据 congtig1 和 congtig2 的序列设计引物,运用 RT-PCR 方法从橡胶草 cDNA 中分别扩增出两条 1 000 bp 左右的特异条带。特异条带克隆测序后,比对发现获得的序列与两个重叠群一致,验证了 EST 序列重叠群拼接的正确。对获得的两条序列进行 ORF 预测,结果显示 congtig1 序列包含一个 696 bp 的开放阅读框(44 ~ 871 位碱基),该开放阅读框编码 232 个氨基酸的蛋白,本文中命名为 TkIDI1 (GenBank 登录号 KC416647); congtig2 序列包含一个 843 bp 的开放阅读框(20 ~ 860 位碱基),该开放阅读框编码 281 个氨基酸的蛋白,命名为 TkIDI2 (GenBank

登录号 KC416648)。两个开放阅读框的起始密码子侧翼序列符合 Kozak 规则^[14]。

2.3 橡胶草 TkIDI 基因的生物信息学分析

将翻译的氨基酸序列对 GenBank 的 Non-redundant protein sequences (nr) 数据库进行 BLASTP 搜索。结果表明, TkIDI1 和 TkIDI2 的氨基酸序列与同科的莴苣 (*Lactuca sativa*)、甜菊 (*Stevia rebaudiana*)、万寿菊 (*Tagetes erecta*) 和菊花 (*Chrysanthemum x morifolium*) 等物种的 IDI 蛋白的一致达到 90% 以上,可见不同物种的 IDI 基因及其编码的蛋白序列间具有高度的同源性。采用 MAGE5.0 对不同来源的 IDI 进行进化树分析,结果显示 36 个 IDI 被分成 5 类群,分别为植物、动物、真菌、古细菌和细菌(见图 2)。

在进化遗传学上,亲缘越近的物种在 IDIs 的分子系统进化树上距离较近,比如大戟科蓖麻和橡胶树、禾本科的玉米和水稻以及菊科的橡胶草、莴苣和菊花,这也反映了该分子系统进化树分析的结果可靠。对比同一物种的两个 IDI 家族可以看出,拟南芥、橡胶树的两个 IDI 家族进化上比较靠近,但番茄、水稻的两个 IDI 距离比较远,橡胶草也具有相同的现象,推测 IDI 的进化速度可能存在差异。

所有 IDI 序列来自于 GenBank 的非冗余蛋白质 Nr 蛋白数据库;相同符号标示为同一物种的两个 IDI 家族成员;各分支数值代表置信度(%)。

采用 Clustal W 将橡胶草 IDI 与其他几种植物 IDI 氨基酸序列进行多序列比对分析,结果显示:植

物 IDI 的 N 端区域没有同源性,该区域主要为信号肽序列;在这个区域后是高度同源的区域,即 NU-DIX(nucleoside diphosphate linked moiety X) 水解酶功能区。参照人和大肠杆菌 IDI 活性位点分析橡胶草 IDI 功能特点,其中 TkIDI1 的镁离子结合位点为 C120 和 E159,锌离子结合位点为 H83、H85、H122、E180 和 E182,而 D52、Q55 和 L58 对其蛋白 N 端的稳定具有重要作用。TkIDI2 的镁离子结合位点为 C125 和 E164,锌离子结合位点为 H88、H90、H127、E185 和 E187,蛋白 N 端 D57、Q60 和 L63 具有稳定蛋白结构作用。总体上看,植物的 IDI 在功能位点上是非常保守的(见图 3)。

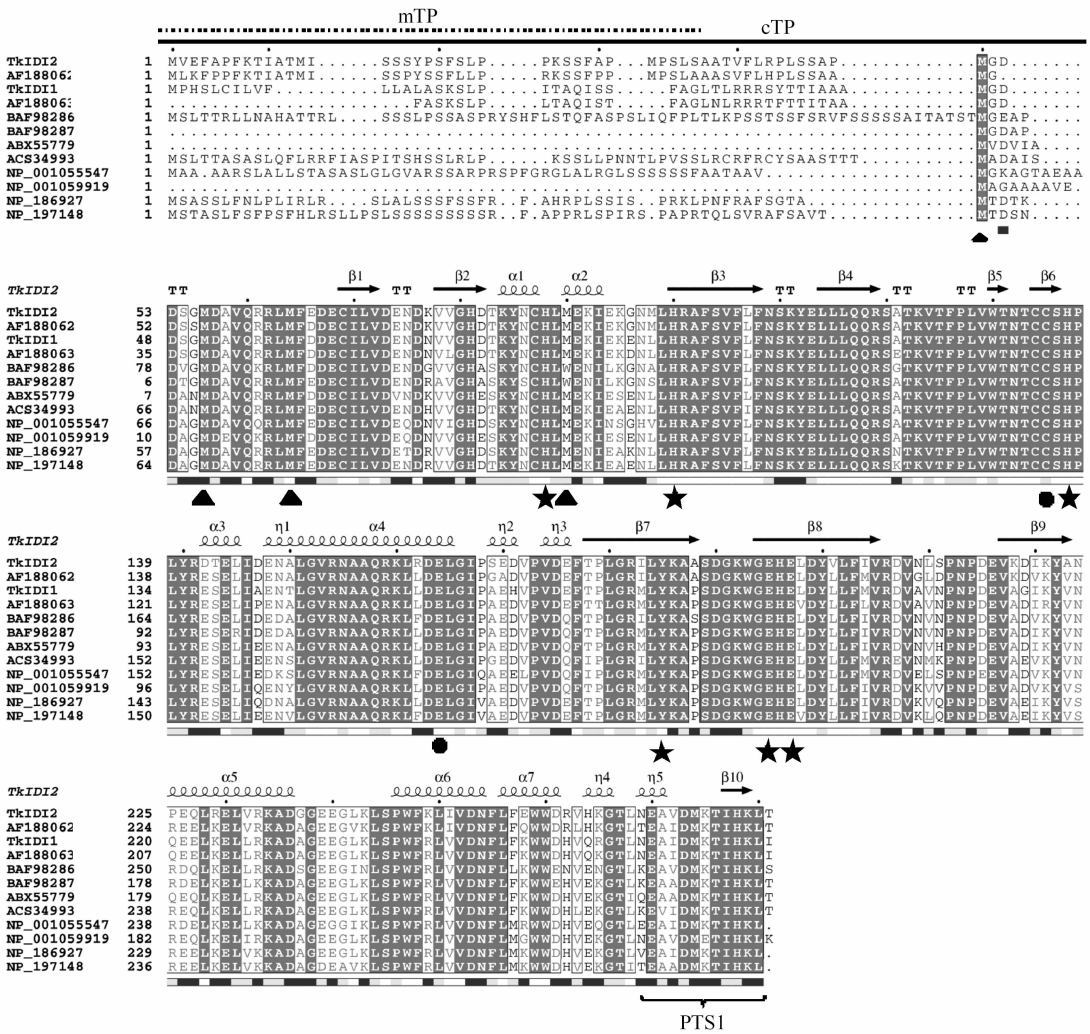


图 3 橡胶草与其他植物 IDI 氨基酸序列比较

Fig. 3 Comparison of homologous amino acid sequences of TkIDI proteins among *Taraxacum kok-saghyz* and other plant species

注:mTP 表示为线粒体定位信号肽,cTP 为叶绿体定位信号肽,PTS1 为过氧化物酶体定位信号;α1-7 以及 η1-5 为 α-螺旋,β1-10 为 β-转角,T 为不规则卷曲;★为锌离子结合位点,●为镁离子结合位点,▲具有稳定蛋白结构作用;AF188062, AF188063 (莴苣);BAF98286, BAF98287 (巴西橡胶树);ABX55779, ACS34993 (西红柿);NP_001055547, NP_001059919 (水稻);NP_186927, NP_197148 (拟南芥)。

Notes:mTP;Mitochondrial targeting signal peptide,cTP;Chloroplast localization signal peptide,PTS1; Peroxidase localization signal peptide;α1-7 and η1-5: α-spiral,β1-10: β-corners, T: Irregular Curl; ★: Zinc ion binding site, ●: Magnesium ion binding site, ▲: Arobe in stabilizing protein structure; AF188062; AF188063 (Lettuce); BAF98286, BAF98287 (Herea brasiliensis) ABX55779, ACS34993 (Tomato); Np_00105547, NP_001059919 (Rice); NP_186927; NP_197148 (Arabidopsis thaliana);

蛋白质在细胞中的定位与蛋白执行的功能密切相关。在植物中,IDI 家族成员及其异构体不仅存在于细胞质,同时在线粒体、过氧化物体^[15]和质体^[12]都有发现,这与 IDI 蛋白 N 端的含有的定位信号相关。采用 PSORT, Predotar、MitoProt、ChloroP、TargetP 和 TargetSP-PTS1 程序对橡胶草 IDI 基因编码产物进行亚细胞定位预测(见表 1)。结果显示,橡胶草 TkIDI1 基因编码产物 N 端含有 20 aa 的信号肽序列和 42 aa 的叶绿体定位信号,可能定位于内质网和叶

绿体中;TkIDI2 基因编码产物同样具有质体定位信号,预测 N 端的 36 aa 为叶绿体定位信号,53 aa 为线粒体定位信号(见图 3),该蛋白可能定位于叶绿体基质和线粒体中。此外,两个基因的短片段转录本编码产物(小分子异构体)均预测为胞质定位。上述橡胶草 IDI 基因编码产物的 C 端均存在过氧化物酶体定位信号 PTS1(见图 3),表明他们都可被引导并组装到过氧化物体上。

表 1 橡胶草 IDI 基因编码产物的亚细胞定位分析

Table 1 Predicting subcellular localization of deduced TkIDI protein

| 蛋白名 | PSORT | Predotar | MitoProt | ChloroP | TargetP | TargetSP-PTS1 |
|---------|----------------------------|--------------------------|--------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| TkIDI1 | 分泌(0.820 [*]) | 内质网(0.99 [*]) | 0.2615 [*] (1-36 aa#) | 0.518 [*] (1-42 aa#) | 信号肽(0.98 [*] ,1-20 aa#) | 0.45 ^{**} (264-275 aa#) |
| TkIDI1t | 胞质(0.450 [*]) | 普遍存在(0.99 [*]) | 0.1690 [*] | 否 | 其他(0.961 [*]) | |
| TkIDI2 | 叶绿体基质(0.558 [*]) | 质体(0.63 [*]) | 0.366 [*] (1-53 aa#) | 0.570(1-36 aa#) | 叶绿体(0.919 [*]) | 0.41 ^{**} (269-280 aa#) |
| TkIDI2t | 线粒体(0.436 [*]) | 普遍存在(0.36 [*]) | | | | |
| TkIDI2t | 胞质(0.450 [*]) | 普遍存在(0.99 [*]) | 0.242 [*] | 否 | 其他(0.956 [*]) | |

注: TkIDI1t 和 TkIDI2t 分别表示为 TkIDI1 和 TkIDI2 的截短转录本编码产物; * 为 Score; # 为信号序列位置; ** 为 E-value。

Notes: TkIDI1t and TkIDI2t: Truncated transcript product coding TkIDI1 and TkzD2; *: Score; #: position signal sequence; **: E-value.

橡胶草 IDI 氨基酸序列的二维结构预测结果显示, TkIDI1 由 51.09% 的 α -螺旋、12.68% 的 β -折叠、30.07% 的不规则卷曲和 6.16% 的 β -转角组成; TkIDI2 由 41.64% 的 α -螺旋、10.68% 的 β -折叠、44.84% 的不规则卷曲和 2.85% 的 β -转角组成(见图 4)。SWISS-MODEL 在线同源建模方法构建的 TkIDI 分子模型显示: 橡胶草的两个 IDI 单体除个

别转角不同外, 总体结构非常相似, 均由 9 个螺旋、7 个不同大小的折叠和一些转角构成, 这与已研究清楚的人和大肠杆菌的 IDI 蛋白的高级结构一致, 都为紧密球形的 α/β 蛋白^[16]。与拟南芥^[9]、巴西橡胶树^[13]等植物预测的 IDI 比较(预测结果未显示), IDI 在高级结构上没有明显变化, 预示其可能具有相同的功能。

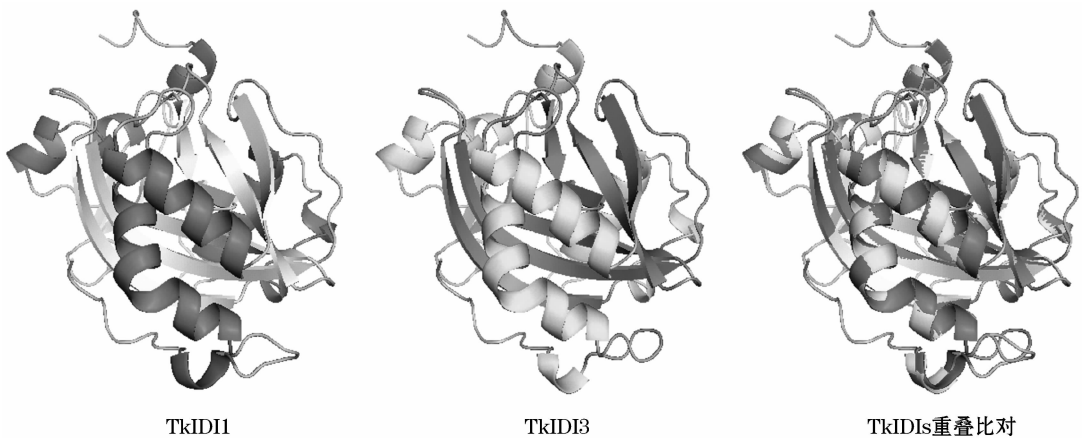


图 4 橡胶草两个 IDI 成员三维结构预测的比较

Fig 4 Predicted tertiary structure of Taraxacum kok-saghyz IDI1 and IDI2 protein

2.4 橡胶草 TkIDI 编码区基因组结构分析

使用 RT-PCR 特异引物从橡胶基因组中克隆到 TkIDI1 和 TkIDI2 编码区的基因组序列, 长度分别为 2 941 和 1 460 bp, 均包含 6 个外显子和 5 个内含子。由于信号肽长度差异, 6 个外显子中, 除第一个外显子长度不一致(TkIDI1 为 188 bp, 其中 132 bp 编码信号肽;

TkIDI2 为 203 bp, 其中 147 bp 编码信号肽), 其余 5 个外显子长度一致, 分别为 56、92、104、137 和 251 bp。TkIDI1 和 TkIDI2 内含子长度则差异较大, TkIDI1 的 5 个内含子都要大于 TkIDI2(见图 5)。总体上, 橡胶草 IDI 基因组序列的组成结构与拟南芥, 水稻(*Oryza sativa*)等植物 IDI 基因组结构相似。

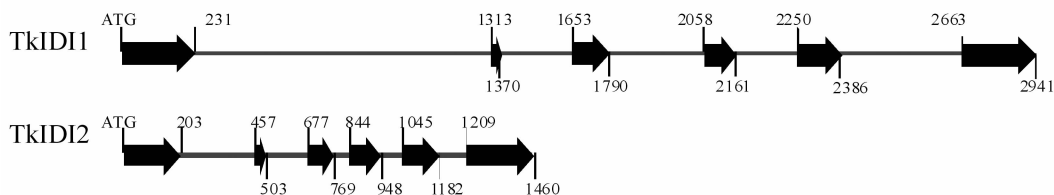


图5 橡胶草两个 IDI 成员编码区的基因组结构示意图

Fig 5 Genomic structures of *Taraxacum kok-saghyz* IDI1 and IDI2

3 讨论

萜类是植物中一类重要的次生代谢物,具有重要的生理生态作用及经济价值。IDI 直接影响萜类合成 5 碳前体库代谢流的流向,是下游代谢途径的总开关^[2]。研究发现大部分的植物都含有两个或两个以上的 IDI 基因,且存在截短转录本现象,如拟南芥、烟草、番茄、长春花等。IDI 家族成员蛋白活性类似,但具有不同的亚细胞定位,例如拟南芥 IDI1 定位于质体,IDI2 定位于线粒体,而他们的短转录片段则分布于胞质^[6]。本文通过电子克隆获得橡胶草两个 IDI 成员 TkIDI1 和 TkIDI2 的完整编码序列,序列分析和亚细胞定位预测显示,TkIDI1 和 TkIDI2 同样具有不同亚细胞定位信号,暗示他们可能独立参与了各细胞区间的异戊二烯代谢。

通常情况下,同一物种的两个 IDI 基因的同源性要高于不同物种来源的 IDI 基因,例如拟南芥的两个 IDI 成员的同源性为 92%,与其他植物 IDI 基因的同源性在 84%~90% 之间。本研究中,两个橡胶草 TkIDI1 和 TkIDI2 的同源性仅为 85%,TkIDI1 与同属植物甜菊和万寿菊的同源性超过 93%,与茄科植物烟草和西红柿也达到 90%,而 TkIDI2 除了与同属莴苣达 90%,与其他植物的同源性均低于 70%,造成了进化树中橡胶草 TkIDI2 与其他 IDI 基因的距离较远,形成独立的分支。TkIDI1 与菊科和茄科植物 IDI 距离较近,表明该基因在菊亚纲植物中具有高度同源,符合克朗奎斯特分类系统^[17] (Cronquist System)。从基因组序列来看,除内含子长度外,橡胶草 TkIDI1 和 TkIDI2 的内含子数目、外显子分布和长度等编码区结构相同,与拟南芥两个 IDI 的基因组结构基本一致,表明 IDI 基因组结构较保守,但与拟南芥 IDI 和 TkIDI1 比较,TkIDI2 的 5 个内含子长度都明显较小,较短的内含子是否与其独特的进化特性相关还有待进一步确认。

通过对巴西橡胶树、橡胶草和银胶菊等产胶植物的研究,人们对天然橡胶生物合成途径有了一定

的认识。天然橡胶生物合成发生在产胶植物乳管胞质中 5 碳单体异戊二烯聚合的过程。5 碳前体 IPP 主要来源于胞质的 MVA 途径,在 IDI 或 TPT 的催化下生成 DMPP、GPP 以及 FPP 等丙烯焦磷酸 (allylic pyrophosphates) 作为聚合的起始物^[5],Tangpakdee 等通过分析不同生长橡胶树胶乳的分子量,推测胶树 IPP 异构酶活性降低,减少了 DMPP 的转化是促进大分子合成的原因^[18],由此可见,IDI 活性与天然橡胶的分子量也存在密切的关系。

参考文献 (References)

- [1] Jan B. van Beilen, Yves Poirier. Establishment of new crops for the production of natural rubber [J]. Trends in Biotechnology, 2007, 25:522-529.
- [2] Anvar U. Buranov, Burkhon J. Elmuradov. Extraction and characterization of latex and natural rubber from rubber-bearing plants [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58:734-743.
- [3] Stephanie C. Espy, Jay D. Keasling, Javier Castellón, Katrina Cornish. Initiator-independent and initiator-dependent rubber biosynthesis in *Ficus elastic* [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2006, 448:13-22.
- [4] Yasuyuki Tanaka, Eng Aik-Hwee, Norimasa Ohya, Naoyuki Nishiyama, Jitladda Tangpakdee, Seiichi Kawahara, Rapepun Wititsuwannakul. Initiation of rubber biosynthesis in *Hevea brasiliensis*. 1. Initiation of rubber biosynthesis in *Hevea brasiliensis*: Characterization of initiating species by structural analysis [J]. Phytochemistry, 1996, 41:1501-1505.
- [5] J. E. Puskas, E. Gautriaud, A. Deffieux, Kennedy, J. P. Natural rubber biosynthesis—A living carbocationic polymerization? [J]. Progress in Polymer Science, 2006, 31:533-548.
- [6] Michael A. Phillips, John C. D'Auria, Jonathan Gershenzon, Eran Pichersky. The *Arabidopsis thaliana* type I Isopentenyl Diphosphate Isomerases are targeted to multiple subcellular compartments and have overlapping functions in isoprenoid biosynthesis [J]. The Plant Cell, 2008, 20:677-696.
- [7] Virginie Durbecq, Germaine Sainz, Yamina Oudjama, Bernard Clantin, Coralie Bompard-Gilles, Catherine Tricot, Jol Caillet, Victor Stalon, Louis Droogmans, Vincent Villeret. Crystal structure of isopentenyl diphosphate: dimethylallyl diphosphate isomerase [J]. EMBO Journal, 2001, 20:1530-1537.
- [8] Karine Berthelot, Yannick Estevez, Alain Deffieux, Frédéric Peruch. Isopentenyl diphosphate isomerase: A checkpoint to isoprenoid biosynthesis [J]. Biochimie, 2012, 94:1621-1634.

- [9] Michael Campbell, Frederick M. Hahn, C. Dale Poulter, Thomas Leustek. Analysis of the isopentenyl diphosphate isomerase gene family from *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Molecular Biology*, 1998, 36:323-328.
- [10] Ayako Nakamura, Hiroshi Shimada, Tatsuru Masuda, Hiroyuki Ohta, Ken-ichiro Takamiya. Two distinct isopentenyl diphosphate isomerases in cytosol and plastid are differentially induced by environmental stresses in tobacco [J]. *FEBS Letters*, 2001, 506: 61-64.
- [11] Jin Sun, Yu-Yang Zhang, Hui Liu, Zhe Zou, Chan-Juan Zhang, Xiao-Hui Zhang, Han-Xia Li, Zhi-Biao Ye. A Novel Cytoplasmic Isopentenyl Diphosphate Isomerase Gene from Tomato (*Solanum lycopersicum*): Cloning, Expression, and Color Complementation [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2010, 28: 473-480.
- [12] Grégory Guirimand, Anthony Guihur, Michael A. Phillips, Audrey Oudin, Ga? lle Glévaec, Céline Melin, Nicolas Papon, Marc Clastre, Benoit St-Pierre, Manuel Rodríguez-Concepción, Vincent Burlat, Vincent Courdavault. A single gene encodes isopentenyl diphosphate isomerase isoforms targeted to plastids, mitochondria and peroxisomes in *Catharanthus roseus* [J]. *Plant Molecular Biology*, 2012, 79:443-459.
- [13] Soo Kyung Oh, Hunseung Kang, Dong Ho Shin, Jaemo Yang, Kyung-Hwan Han. Molecular cloning and characterization of a functional cDNA clone encoding isopentenyl diphosphate isomerase from *Hevea brasiliensis* [J]. *Journal Plant Physiology*, 2000, 157:549-557.
- [14] Marilyn Kozak. An analysis of 5'noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs [J]. *Nucleic Acids Research*, 1987, 15:8125-8148.
- [15] Ana C. Ramos-Valdivia, Robert van der Heijden, Robert Verpoorte. Isopentenyl diphosphate isomerase: a core enzyme in isoprenoid biosynthesis. A review of its biochemistry and function [J]. *Natural Product Reports*, 1997, 14:591-603.
- [16] Cheng Zhang, Lin Liu, Hang Xu, Zhiyi Wei1, Yanli Wang, Yajing Lin, Weimin Gong. Crystal structures of human IPP isomerase: new insights into the catalytic mechanism [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2007, 366:1437-1446.
- [17] William R. Anderson. An Integrated System of Classification of Flowering Plants [M]. New York: Columbia University Press, 1981, 1262.
- [18] Jitladda Tangpakdee, Yasuyuki Tanaka, Rapepun Wititsuwannakul, Nopphakaew Chareonthiphakorn. Possible mechanisms controlling molecular weight of rubbers in *Hevea brasiliensis* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 42:353-355.