

杨千叶,黄可佳,张阳,等. 卷叶贝母异戊烯基焦磷酸异构酶基因(*IDI*)的克隆与分析[J]. 江苏农业科学,2019,47(16):67-70.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.16.014

卷叶贝母异戊烯基焦磷酸异构酶基因(*IDI*)的克隆与分析

杨千叶¹,黄可佳¹,张阳¹,李锐²

(1. 成都大学四川抗菌素工业研究所,四川成都 610051; 2. 成都大学药学与生物工程学院,四川成都 610106)

摘要:旨在克隆卷叶贝母(*Fritillaria cirrhosa* D. Don)生物碱合成过程中的关键酶——异戊二烯焦磷酸异构酶(isopentenyl diphosphate isomerase,简称 *IDI*),并运用生物信息学和荧光定量方法对其功能进行分析,为卷叶贝母甾类生物碱合成途径及其调控机制的研究奠定基础。以卷叶贝母再生鳞茎为试验材料,基于转录组测序结果,通过 PCR 技术克隆川贝母 *IDI* 基因(*FcIDI*)的开放阅读框(open reading frame,简称 ORF)序列,运用生物信息学方法对该基因进行分析,预测其编码蛋白的结构与功能,并通过荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 *FcIDI* 基因在卷叶贝母根、茎、叶、野生鳞茎、再生鳞茎及愈伤组织中的表达情况。结果表明,*FcIDI* 的 ORF 片段为 885 bp,编码 294 个氨基酸,与大豆(*Glycine max*)、杜仲(*Eucommia ulmoides*)、番薯(*Ipomoea*)、广藿香(*Pogostemon cablin*)等植物 *IDI* 蛋白的相似性达 85% 以上;*FcIDI* 蛋白的二级、三级结构预测结果表明, α -螺旋及不规则卷曲是其整体蛋白质结构中的主要组成结构元件;qRT-PCR 试验结果表明,*FcIDI* 在野生鳞茎中的表达量远高于根、茎、叶等其他植物组织,再生鳞茎的 *IDI* 表达量高于野生鳞茎,在愈伤组织中的表达量最高。生物信息学分析和不同植物组织部位及组培诱导物的 *IDI* 相对表达量差异结果显示,*FcIDI* 是 1 个生物碱合成途径中的关键蛋白质,并受激素组合诱导表达,研究结果为提高卷叶贝母中的生物碱含量及深入研究植物 *IDI* 的功能奠定了理论基础。

关键词:卷叶贝母;异戊二烯焦磷酸异构酶;克隆;生物信息学;基因表达

中图分类号: Q943.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)16-0067-04

卷叶贝母(*Fritillaria cirrhosa* D. Don)又称川贝母,为百合科多年生草本植物,是一种主产于四川的高原濒危药材。干燥鳞茎作为其主要药用部位,含有生物碱、有机酸、皂苷、氨基酸等 13 种化学物质^[1]。在传统医学上,卷叶贝母主要用于治疗肺热燥咳、痰多胸闷、咯痰带血等症^[2]。近期研究表明,川贝母的干燥鳞茎富含川贝碱、西贝碱、贝母素乙和贝母素甲等甾类生物碱^[3],此外还具有十分广泛的生物学活性,如降压、抗菌、消炎、抗肿瘤等^[4-7]。目前,卷叶贝母的市场需求量大但产量低,供需矛盾日益突出,并且其野生资源遭受大肆采挖^[8]。面对卷叶贝母资源日益匮乏的现状,要从根本上解决卷叶贝母资源问题,就要对其药效成分的生物合成机制进行研究,以便运用基因工程手段进行分子育种,进而提高药效成分含量。

甾类生物碱的生物合成很复杂,许多研究表明,其生物合成途径与三萜类化合物相似,目前植物萜类合成的上游途径已基本明确,异戊烯基焦磷酸(IPP)是所有萜类化合物合成的中心前体,在植物中有 2 条合成途径,即 2-甲基-D-赤

鲜糖醇-4-磷酸(MEP)途径和甲羟戊酸(MVA)途径^[9],在这 2 种途径中均存在异戊二烯焦磷酸异构酶(*IDI*)催化异戊烯基焦磷酸(IPP)异构化形成二甲丙烯焦磷酸(DMADP)的过程。*IDI* 作为萜类生物合成过程中的一个重要调节因子,其过量表达有利于促进下游产物的生物合成^[10]。研究表明,在大肠杆菌中过表达番茄 *SIIDI* 基因、酵母 *ScIDI* 基因、灵芝 *GIIDI* 基因和喜树 *CaIDI* 基因,均能导致类胡萝卜素的生物合成和累积^[11-14]。在杜仲中,过表达 *EuIDI* 基因能增加反式聚异戊二烯的生物合成^[15]。目前已有许多植物中的 *IDI* 基因被克隆,如喜树、山榛、柴胡和丹参等^[11,16-22]。然而迄今,关于卷叶贝母异戊烯基焦磷酸异构酶基因(*FcIDI*)的克隆却鲜有报道。

为了探究卷叶贝母 *IDI* 基因是否参与萜类合成、甾类生物碱合成等代谢过程,为甾类、三萜类化合物代谢途径提供优质基因资源,本研究基于笔者前期研究得到的转录组数据,运用分子生物学技术克隆卷叶贝母的 *IDI* 基因,并对其进行序列分析和组织特异性表达分析,以期阐明卷叶贝母的甾类生物碱合成途径及其调控机制奠定基础。

1 材料与与方法

1.1 试验材料

卷叶贝母野生材料来自四川省康定折多山川贝母野生抚育基地,愈伤组织、再生鳞茎由笔者所在实验室经组织培养获得。基因克隆所用材料为卷叶贝母的再生鳞茎,基因组织特异性表达分析所用野生材料为 3 年生卷叶贝母的根、茎、叶,采样日期为 2016 年 7 月 12 日。

收稿日期:2018-04-27

基金项目:四川省教育厅自然科学重点项目(编号:17ZA0078);成都大学 2017 年校青年基金(编号:2017XJZ04)。

作者简介:杨千叶(1994—),女,河南商丘人,硕士,主要从事药用植物生物化学与分子生物学方面的研究。E-mail: qianyeyang@foxmail.com。

通信作者:李锐,博士,讲师,主要从事药用植物生物化学与分子生物学方面的研究。E-mail: lirui1986523@163.com。

大肠杆菌菌株,由笔者所在实验室保存;总 RNA 提取试剂盒,购自天根生化科技(北京)有限公司;荧光定量试剂盒(SsoFast™ EvaGreen® Sapermix),购自 BIO-RAD 公司;反转录试剂盒(Prime-Script RT reagent Kit)、Pfu 高保真酶、pMD19-T 载体,购自 TaKaRa 公司;引物合成及基因测序由北京六合华大基因科技有限公司完成。

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 的提取与 cDNA 的合成 使用植物总 RNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]提取卷叶贝母再生鳞茎总 RNA,按照反转录试剂盒(TaKaRa 公司)说明书合成 cDNA 第 1 链,将反转录产物保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$,用于后续基因克隆试验。

1.2.2 *FcIDI* 基因的克隆与生物信息学分析 根据笔者所在实验室得到的卷叶贝母转录组测序数据库,用 primer premier 5.0 软件设计 *FcIDI* 基因的特异性引物,并命名为 *FcIDIF* 和 *FcIDIR*(表 1)。以反转录的 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增。将所得产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离并切胶回收后克隆到 pMD19-T 载体上,转化大肠杆菌(*Escherichia coli*) Top10 感受态细胞。菌落经 PCR 验证后,挑取阳性克隆送至北京六合华大基因科技有限公司进行测序分析,获得重组质粒 pMD19-*FcIDI*。

将克隆的 *FcIDI* 基因编码区翻译成氨基酸序列,用美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology

Information,简称 NCBI)网站的 BLASTp 工具(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行蛋白质同源性搜索;用 DNAMAN 6.0 软件对目前已经克隆 *IDI* 的代表性植物进行氨基酸序列同源性比对;用 MEGA 5.1 软件构建分子进化树;用 ExPASy 在线服务器的 ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)对 *FcIDI* 蛋白质的结构特点进行基本理化性质分析;分别采用 SOPMA(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)和 SWISS-MODE(<http://swissmodel.expasy.org/>)在线分析软件对 *FcIDI* 蛋白的二级、三级结构进行预测分析。

1.2.3 卷叶贝母 *IDI* 基因表达量分析 分别取 3 年生卷叶贝母的根、茎、叶、鳞茎以及由笔者所在实验室通过组织培养获得的愈伤组织和再生鳞茎,提取总 RNA。参照反转录试剂盒说明书,合成 cDNA 第 1 链,以卷叶贝母 18S 基因(AY616727.1)为内参,利用 primer premier 5.0 软件设计 qRT-PCR 扩增引物,分别命名为 *qFcIDIF* 和 *qFcIDIR*,序列见表 1;将合成的各样品 cDNA 稀释 50 倍后作为模板,用 SsoFast™ EvaGreen® Sapermix 试剂盒进行 qRT-PCR 检测,每组样品设 3 个平行重复,并进行 3 次生物学重复试验。反应在 ABI7000 荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems)上进行扩增,扩增曲线、溶解曲线、标准曲线由软件自动生成。所得数据用内参基因校准后使用 $C_T(2^{-\Delta\Delta C_T})$ 法计算目的基因的相对表达量。

表 1 *FcIDI* 基因克隆和荧光定量分析的引物序列

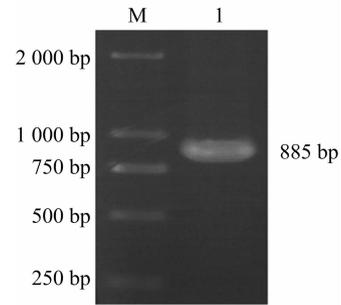
用途	引物序列 (5'→3')	退火温度 T_m ($^{\circ}\text{C}$)
<i>FcIDI</i> 基因克隆	<i>FcIDIF</i> : ATGTCGGCGTCAAGCCT; <i>FcIDIR</i> : TCATATCAGCTTATGGATGG	56
<i>FcIDI</i> 基因 qPCR	<i>qFcIDIF</i> : TATCTCCTCTTCATCGTCCGT; <i>qFcIDIR</i> : GCCTTCCTCAGCAGTCTTTTC	56
<i>Fc18S</i> 内参基因	<i>Fc18sF</i> : TACGACTCTCGGAACGGA; <i>Fc18sR</i> : CAAAGGGGCAATGGGAACA	56

2 结果与分析

2.1 *FcIDI* 基因的克隆与生物信息学分析

以卷叶贝母再生鳞茎 cDNA 为模板,使用表 1 的 *FcIDI* 基因特异性引物,通过 PCR 技术扩增得到约 900 bp 的片段(图 1),经测序鉴定结合转录组数据分析得出,*FcIDI* 基因的开放阅读框(ORF)序列长 885 bp,编码蛋白含有 294 个氨基酸残基,其基本理化性质如下:总原子数为 4 721 个,原分子组成为 $C_{1\ 500}H_{2\ 370}N_{406}O_{435}S_{10}$,带负电的氨基酸有 45 个[天冬氨酸(Asp) + 谷氨酸(Glu)],带正电的氨基酸有 36 个[精氨酸(Arg) + 赖氨酸(Lys)],其理论分子量为 33.3 ku,理论等电点(pI 值)为 5.61,不稳定指数为 37.85,属于稳定蛋白;脂肪指数为 99.83,总平均疏水性(GRAVY)为 -0.198 ,为亲水蛋白。将由 *FcIDI* 基因推测的氨基酸序列在 NCBI 上进行 BLASTp 检索发现,*FcIDI* 推测蛋白与大豆(*Glycine max*)、杜仲(*Eucommia ulmoides*)、番薯肯尼亚属(*Ipomoea Kenyan*)、广藿香(*Pogostemon cablin*)等植物 *IDI* 蛋白的相似性达 85% 以上。

用 DNAMAN 6.0 软件进行同源比对,从图 2 可以看出,*FcIDI* 蛋白具有植物 *IDI* 蛋白的高度保守性。在 BLASTp 分析的基础上,根据 8 种植物 *IDI* 基因的氨基酸序列同源性,使用 MEGA 5.1 软件作出系统发育进化树。由图 3 可见,*FcIDI*



M—DL2000 marker; 1—*FcIDI*

图 1 *FcIDI* 基因 ORF 的克隆

与同属于单子叶的中国莲的 NnIDI 蛋白处于同一进化枝,表明二者的亲缘关系较近。

分别采用 SOPMA 和 SWISS-MODE 在线分析软件对 *FcIDI* 氨基酸序列的二级、三级结构进行预测。图 4 结果表明,*FcIDI* 蛋白二级结构中 α -螺旋(H)占 45.24%,无规则卷曲(C)占 41.25%,延伸带(E)占 13.27%。表明 α -螺旋及不规则卷曲是其整体蛋白质结构中的主要结构组成元件;此外, β -转角和延伸链散布于整个蛋白质中。通过 SWISS-MODE 进行三级结构的同源建模,找到 *FcIDI* 的同源模型 PDB:2i6k.1.A,其三维结构通过 X 射线(X-ray)被测定出

85MSASTFLRAASVAKLGLDAAAGVFFAIRLHRSEPIILRLRFSSRTAATAAFPMKGIPLTALAGMDAVCRRLMFEDECILY
120	MFLNFCRGSVVAARAAVSKRHFCLEPMYNNNTINYSCEFPPSLSFLGLINTAITTFAAAVYDHRRRRFFPLAASSSSSLATSISSFPAGNNNAFISGMDAVCRRLMFEDECILY
240MAMAANTIIILQNFALSFSAFERFSLLSRSLKCFPLRVCSSISAVTISLPS..AMGVLSAASAMDAVCRRLMFEDECILY
79MASCIIAVLSLQCLFKARNNGALSFSAFSTSSRSLSRSLSFSCNCKSHNPLTAIPARVLSLSSLLTMSGETPCNAGMDAVCRRLMFEDECILY
97MACSSIVLTRCNLFKRNVTACVTHSFSTFGSRSLSSLSFSCNRRSSHIPLSLAPFSSFTAMG...MGLTAVAGMDAVCRRLMFEDECILY
92MGDSAVIAGMDAVCRRLMFEDECILY
27MGDSAVIAGMDAVCRRLMFEDECILY
146MGDSAVIAGMDAVCRRLMFEDECILY
205	DEHRAVVGHD SKYNCHLMKIE SENLLHRAFSVLEFNKYEYELLOQRS AKKVFPELVWVNTCCSHPLVRESELI DENLCVNRNAAQRKLLDELGIPAEVPEVCFELGR LYKAPSDBGK
240	DEHRAVVGHD SKYNCHLMKIE SENLLHRAFSVLEFNKYEYELLOQRS AKKVFPELVWVNTCCSHPLVRESELI DENLCVNRNAAQRKLLDELGIPAEVPEVCFELGR LYKAPSDBGK
146	DEHRAVVGHD SKYNCHLMKIE SENLLHRAFSVLEFNKYEYELLOQRS AKKVFPELVWVNTCCSHPLVRESELI DENLCVNRNAAQRKLLDELGIPAEVPEVCFELGR LYKAPSDBGK
199	DEHRAVVGHD SKYNCHLMKIE SENLLHRAFSVLEFNKYEYELLOQRS AKKVFPELVWVNTCCSHPLVRESELI DENLCVNRNAAQRKLLDELGIPAEVPEVCFELGR LYKAPSDBGK
21	DEHRAVVGHD SKYNCHLMKIE SENLLHRAFSVLEFNKYEYELLOQRS AKKVFPELVWVNTCCSHPLVRESELI DENLCVNRNAAQRKLLDELGIPAEVPEVCFELGR LYKAPSDBGK
217	DEHRAVVGHD SKYNCHLMKIE SENLLHRAFSVLEFNKYEYELLOQRS AKKVFPELVWVNTCCSHPLVRESELI DENLCVNRNAAQRKLLDELGIPAEVPEVCFELGR LYKAPSDBGK
212	DEHRAVVGHD SKYNCHLMKIE SENLLHRAFSVLEFNKYEYELLOQRS AKKVFPELVWVNTCCSHPLVRESELI DENLCVNRNAAQRKLLDELGIPAEVPEVCFELGR LYKAPSDBGK
147	DEHRAVVGHD SKYNCHLMKIE SENLLHRAFSVLEFNKYEYELLOQRS AKKVFPELVWVNTCCSHPLVRESELI DENLCVNRNAAQRKLLDELGIPAEVPEVCFELGR LYKAPSDBGK
146	DEHRAVVGHD SKYNCHLMKIE SENLLHRAFSVLEFNKYEYELLOQRS AKKVFPELVWVNTCCSHPLVRESELI DENLCVNRNAAQRKLLDELGIPAEVPEVCFELGR LYKAPSDBGK
294	WGEHLDMLLE ITRN NVL ENBEVAV KAN DEKELILRRADAGEEGLKLSFENFRILVWVNEFLKAWDHLVAGTIIICEVADMKTIHSHI
329	WGEHLDMLLE ITRN NVL ENBEVAV KAN DEKELILRRADAGEEGLKLSFENFRILVWVNEFLKAWDHLVAGTIIICEVADMKTIHSHI
335	WGEHLDMLLE ITRN NVL ENBEVAV KAN DEKELILRRADAGEEGLKLSFENFRILVWVNEFLKAWDHLVAGTIIICEVADMKTIHSHI
388	WGEHLDMLLE ITRN NVL ENBEVAV KAN DEKELILRRADAGEEGLKLSFENFRILVWVNEFLKAWDHLVAGTIIICEVADMKTIHSHI
110	WGEHLDMLLE ITRN NVL ENBEVAV KAN DEKELILRRADAGEEGLKLSFENFRILVWVNEFLKAWDHLVAGTIIICEVADMKTIHSHI
406	WGEHLDMLLE ITRN NVL ENBEVAV KAN DEKELILRRADAGEEGLKLSFENFRILVWVNEFLKAWDHLVAGTIIICEVADMKTIHSHI
391	WGEHLDMLLE ITRN NVL ENBEVAV KAN DEKELILRRADAGEEGLKLSFENFRILVWVNEFLKAWDHLVAGTIIICEVADMKTIHSHI
341	WGEHLDMLLE ITRN NVL ENBEVAV KAN DEKELILRRADAGEEGLKLSFENFRILVWVNEFLKAWDHLVAGTIIICEVADMKTIHSHI
178	WGEHLDMLLE ITRN NVL ENBEVAV KAN DEKELILRRADAGEEGLKLSFENFRILVWVNEFLKAWDHLVAGTIIICEVADMKTIHSHI

图2 FcIDI 与其他植物 IDI 氨基酸序列的比对分析

来。经过比对, FcIDI 和 2i6k. 1. A 的氨基酸序列一致性高达 52. 42%。

2.2 FcIDI 基因表达量的变化分析

以 2016 年 7 月 12 日采集的卷叶贝母根、茎、叶、鳞茎及由该鳞茎培养诱导的愈伤组织和再生鳞茎为材料, 采用荧光定量 PCR 方法检测 FcIDI 基因在不同组织中的表达差异水平。如图 5 所示, FcIDI 基因在所检测的组织中均有表达, 在愈伤组织中的表达量最高, 达到根的 15. 9 倍, 其次为再生鳞茎中, 根中的表达量最低, 叶、茎中的表达量较高, 分别是根的 3. 3、3. 7 倍。

3 讨论

FcIDI 基因克隆是以卷叶贝母再生鳞茎为材料、以转录组测序结果为基础, 通过 PCR 技术克隆获得其 ORF 序列。经生物信息学结构分析表明, 卷叶贝母 IDI 蛋白与其他植物的 IDI 蛋白具有较高的同源性, IDI 为卷叶贝母生物碱合成途径中的关键酶, FcIDI 的表达为下游卷叶贝母总生物碱的合成提供了前体物质, 因此 FcIDI 的研究尤为重要。

本研究通过检测卷叶贝母不同植物组织部位 IDI 的相对表达量, 发现经过组织培养技术获得的愈伤组织和再生鳞茎中 IDI 的相对表达量较野生贝母各组织的高, 进一步证实, 通过组织培养技术获得的贝母愈伤组织和再生鳞茎能够有效提高其生物碱含量^[23-24]。因此, 本研究推测, 组织培养物中可能存在生物碱高效积累的机制。

本研究为卷叶贝母的分子生物学研究提供了基因资源, 并为后续 FcIDI 的研究奠定了基础。笔者所在课题组后续将对 FcIDI 蛋白进行纯化和酶活性检测分析, 进一步研究 FcIDI 基因的功能, 从而为卷叶贝母甾类生物碱合成途径的阐明奠定基础。

参考文献:

[1] 王德峰. 柑橘油[J]. 北京日化, 2000(3): 25-30.

[2] Wang D D, Zhu J Y, Wang S, et al. Antitussive, expectorant and anti-inflammatory alkaloids from bulbous *Fritillariae Cirrhosae*[J]. *Fitoterapia*, 2011, 82(8): 1290-1294.

[3] 王强, 兰利琼, 傅华龙. 秋水仙素诱导川贝母愈伤组织多倍体的研究[J]. *植物科学学报*, 2002, 20(6): 449-452.

[4] Cho I H, Lee M J, Kim J H, et al. *Fritillaria ussuriensis* extract inhibits the production of inflammatory cytokine and MAPKs in mast cells[J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2011, 75(8): 1440-1445.

[5] Oh H C, Kang D G, Lee S Y, et al. Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory alkaloids from *Fritillaria ussuriensis*[J]. *Planta Medica*, 2003, 69(6): 564-565.

[6] Wang D D, Feng Y, Li Z, et al. *In vitro* and *in vivo* antitumor activity of bulbous *Fritillariae Cirrhosae* and preliminary investigation of its mechanism[J]. *Nutrition and Cancer - An International Journal*, 2014, 66(3): 441-452.

[7] Chen L H, Lu X P, Liang X L, et al. Mechanistic studies of the transport of peimine in the Caco-2 cell model[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2016, 6(2): 125-131.

[8] 张礼, 伍燕华, 付绍兵, 等. 栽培密度和施肥对川贝母生长和产

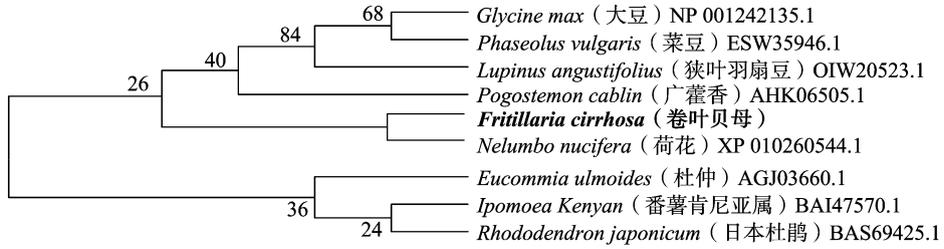


图3 卷叶贝母 FcIDI 蛋白与其他植物中 IDI 蛋白氨基酸序列的进化分析

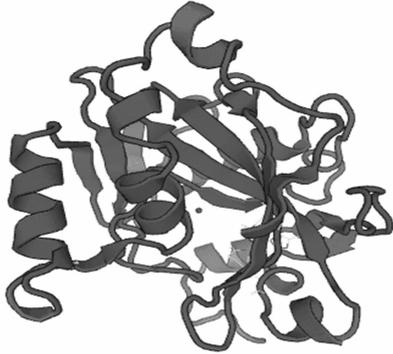


图4 FcIDI 蛋白的三级结构预测

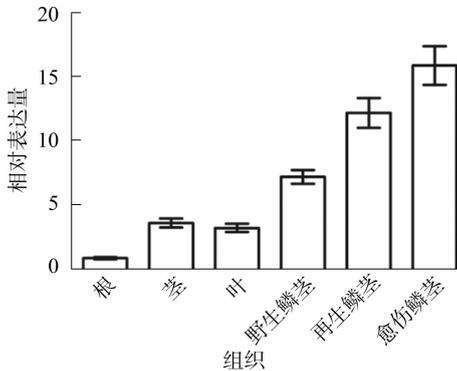


图5 不同组织中 FcIDI 基因表达量的变化

量的影响[J]. 江苏农业科学,2017,45(3):119-121.

[9] 罗永明,刘爱华,李琴,等. 植物萜类化合物的生物合成途径及其关键酶的研究进展[J]. 江西中医学院学报,2003,15(1):45-51.

[10] Gallagher C E, Cervantes - Cervantes M, Wurtzel E T. Surrogate biochemistry: use of *Escherichia coli* to identify plant cDNAs that impact metabolic engineering of carotenoid accumulation [J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2003,60(6):713-719.

[11] Pan X C, Chen M, Liu Y, et al. A new isopentenyl diphosphate isomerase gene from *Camptotheca acuminata*: cloning, characterization and functional expression in *Escherichia coli* [J]. DNA Sequence,2008,19(2):98-105.

[12] Sun J, Zhang Y Y, Liu H, et al. A novel cytoplasmic isopentenyl diphosphate isomerase gene from tomato (*Solanum lycopersicum*):

cloning, expression, and color complementation[J]. Plant Molecular Biology Reporter,2010,28(3):473-480.

[13] Kajiwarra S, Fraser P D, Kondo K, et al. Expression of an exogenous isopentenyl diphosphate isomerase gene enhances isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli* [J]. Biochemical Journal,1997,324(2):421-426.

[14] Wu F L, Shi L, Yao J, et al. The cloning, characterization, and functional analysis of a gene encoding an isopentenyl diphosphate isomerase involved in triterpene biosynthesis in the Lingzhi or Reishi medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (higher Basidiomycetes) [J]. International Journal of Medicinal Mushrooms,2013,15(3):223.

[15] Chen R, Harada Y, Bamba T, et al. Overexpression of an isopentenyl diphosphate isomerase gene to enhance trans - polyisoprene production in *Eucommia ulmoides* Oliver [J]. BMC Biotechnology, 2012,12(1):78.

[16] 王伟,陆辉强,刘万宏,等. 玉米异戊烯焦磷酸异构酶基因的克隆及其功能分析[J]. 西北植物学报,2008(9):1715-1719.

[17] 杨滢,周露,化文平等. 丹参异戊烯焦磷酸异构酶基因 (*SmiPI*) 的生物信息学及表达分析[J]. 植物生理学报,2011,47(11):1086-1090.

[18] Dong L M, Sui C, Liu Y J, et al. Validation and application of reference genes for quantitative gene expression analyses in various tissues of *Bupleurum chinense* [J]. Molecular Biology Reports,2011,38(8):5017-5023.

[19] 汪迎春,唐克轩. 山榛中异戊烯焦磷酸异构酶基因的克隆及分析[J]. 中国农业科技导报,2007(4):95-100.

[20] 仇键,刘实忠,张志平等. 橡胶草异戊烯焦磷酸异构酶基因的电子克隆及分析[J]. 生物信息学,2013(3):209-215.

[21] Campbell M, Hahn F M, Poulter C D, et al. Analysis of the isopentenyl diphosphate isomerase gene family from *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Molecular Biology,1998,36(2):323-328.

[22] 魏琦超,畅丽萍,薛晓峰,等. 大豆异戊烯焦磷酸异构酶基因的电子克隆及生物信息学分析[J]. 生物技术通报,2010(11):96-100.

[23] 朱丹妮,蒋莹,陈婷,等. 组织培养川贝母化学成分和药理作用的研究[J]. 中国药科大学学报,1992,23(2):118-121.

[24] 陈敏,陈和荣,钟凤林,等. 川贝母组织培养的研究[J]. 中国中药杂志,1995,20(8):461-462,511.