



铁皮石斛 *DoSMT2* 基因的功能分析

林江波, 王伟英, 邹 晖, 戴艺民*

(福建省农业科学院 亚热带农业研究所, 福建漳州 363005)

摘 要: 为了揭示铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)甾醇 C-24 甲基转移酶 2 基因(*DoSMT2*)在甾醇代谢过程的功能, 该研究通过根癌农杆菌介导法将来源于铁皮石斛的 *DoSMT2* 基因转化烟草(*Nicotiana tabacum*), 并采用 qRT-PCR 技术检测 *DoSMT2* 基因在转基因烟草叶片中的表达, 采用气相色谱质谱法分析菜油甾醇和谷甾醇的含量。结果显示: (1) 成功获得 *DoSMT2* 基因的开放阅读框(1 119 bp), 并成功构建正义植物表达载体质粒 pCXSND-*DoSMT2*, 经农杆菌介导的烟草叶盘转化法转化烟草并鉴定, 获得 4 株阳性转基因烟草植株。(2) Southern blot 结果表明, 4 株转基因烟草植株都有 1 条杂交信号带, 而非转基因烟草植株没有, 说明外源 *DoSMT2* 基因都以单拷贝整合到 4 株转基因烟草基因组中。(3) qRT-PCR 检测显示, 非转基因烟草未检测到外源 *DoSMT2* 基因的表达, 4 株转基因烟草都能检测到 *DoSMT2* 基因的表达, 且表达水平差异极显著, 各株系表达量高低依次为 P3>P1>P2 (P4)。(4) 气相色谱质谱分析显示, 转 *DoSMT2* 基因烟草叶片的菜油甾醇含量均极显著低于非转基因烟草叶片, 而谷甾醇含量均极显著高于非转基因烟草叶片。研究表明, *DoSMT2* 具有催化 24-亚甲基胆甾烯醇转化形成 24-亚乙基胆甾烯醇活性。

关键词: 铁皮石斛; 甾醇 C-24 甲基转移酶; 烟草; 遗传转化; 功能

中图分类号: Q785; Q786; Q789 **文献标志码:** A

Functional Analyses of *DoSMT2* Gene Isolated from *Dendrobium officinale*

LIN Jiangbo, WANG Weiyang, ZOU Hui, DAI Yimin*

(Fujian Academy of Agricultural Sciences, Subtropical Agriculture Research Institute, Zhangzhou, Fujian 363005, China)

Abstract: In order to reveal the function of the sterol C-24 methyltransferase 2 gene (*DoSMT2*) in the sterol metabolism process of *Dendrobium officinale*, we firstly transformed the *DoSMT2* gene into tobacco (*Nicotiana tabacum*) by *Agrobacterium tumefaciens* mediated method. qRT-PCR was then applied to detected the *DoSMT2* gene expression in transgenic tobacco leaves, and the contents of brassinosterol and sitosterol were analyzed by GC-MS. The results showed that: (1) a 1 119bp open-reading-frame (ORF) of *DoSMT2* gene was successfully obtained, thereafter the sense plant expression vector pCXSND-*DoSMT2* was successfully constructed too. Four positive transgenic tobacco plants were obtained and identified by tobacco leaf disc transformation through *A. tumefaciens* mediated method. (2) Southern blot results showed that there was a hybridization signal band in all the four transgenic tobacco plants, while it was not found in non-transgenic tobacco plants, which indicated that the foreign gene *DoSMT2* was integrated into the genome of the transgenic tobacco plants in a single-copy mode. (3) The *DoSMT2* gene expression was

收稿日期: 2021-01-14; 修改稿收到日期: 2021-03-19

基金项目: 福建省自然科学基金 (2018J01119)

作者简介: 林江波 (1976—), 男, 硕士, 副研究员, 从事农业生物技术研究。E-mail: 345953257@qq.com

* 通信作者: 戴艺民, 博士, 研究员, 从事农业生物技术研究。E-mail: dymttn@163.com

not detected in non-transgenic tobacco, while the expression of *DoSMT2* gene could be detected in all four transgenic tobacco plants by qRT-PCR, and the difference of expression level was significant. The expression level of each line was $P3 > P1 > P2(P4)$, in turn. (4) The GC-MS analysis results showed that the content of campesterol in transgenic tobacco leaves was significantly lower than that in non-transgenic tobacco leaves, while the content of sitosterol in transgenic tobacco leaves was significantly higher than that in non-transgenic tobacco leaves. This study indicated that the *DoSMT2* protein had the catalytic activity in the transformation from 24-methylene lophenol to 24-ethylidene lophenol.

Key words: *Dendrobium officinale*; sterol-C-24-methyl transferase; tobacco; genetic transformation; function

植物甾醇是一类甾体类植物天然活性物质,具有延缓衰老^[1]、抗氧化^[2]和抗肿瘤^[3]等功效。植物甾醇根据侧链 C-24 位上烷基的有无分为无烷基甾醇、甲基甾醇和乙基甾醇,菜油甾醇和菜籽甾醇属于甲基甾醇,豆甾醇和 β -谷甾醇属于乙基甾醇^[4-5]。周海玥等^[6]研究发现,豆甾醇和 β -谷甾醇具有改善非酒精性脂肪肝病细胞脂肪变性程度及减轻氧化应激反应的作用;张硕等^[7]研究发现白花蛇舌草豆甾醇具有抑制肝癌细胞增殖,促进癌细胞凋亡的作用;周玲玉等^[8]研究发现 β -谷甾醇可以诱导人肺癌 A549 细胞 G2/M 期细胞周期阻滞,引起癌细胞凋亡。甾醇 C-24 甲基转移酶 2(*SMT2*)催化 24-亚甲基胆甾烯醇合成 24-亚乙基胆甾烯醇^[9-10],是乙基甾醇合成关键酶,开展 *SMT2* 基因功能研究对研究植物甾醇的代谢和调控具有重要意义。目前,已经从多种植物中克隆到 *SMT2* 基因^[11-13],但是开展 *SMT2* 基因功能研究的还少有报道。

铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)是兰科(Orchidaceae)石斛属(*Dendrobium* Sw.)的名贵中药材,位列“中华九大仙草”之首,其功效成分主要有多糖、石斛碱、黄酮和甾醇类等^[14-18],具有提高免疫力和抗肿瘤等生理活性^[19-22]。本课题组基于对铁皮石斛茎和叶的转录组测序,分析了铁皮石斛植物甾醇的代谢途径,分 3 个阶段,50 个 unigenes (30 种酶)参与,铁皮石斛甾醇 C-24 甲基转移酶 2 基因(*DoSMT2*)在叶的表达量高于茎,生长期高于成熟期^[23];克隆了铁皮石斛 *DoSMT2* 基因的全长 cDNA 序列,生物信息学分析结果表明 *DoSMT2* 蛋白属于 AdoMet-MTases 超级家族,含有 4 个 S-腺苷蛋氨酸结合位点、1 个甲基转移酶保守结构域和 1 个甾醇甲基转移酶 C 末端保守结构域,与深圳拟兰(*Apostasia shenzhenica*)的 *SMT2* 亲缘关系最近^[24]。本研究构建了 *DoSMT2* 基因正义植物表达载体,利用农杆菌介导遗传转化烟草,分析 *DoSMT2* 基因功能,以期为进一步了解铁皮石斛植

物甾醇代谢机理奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 菌株、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 菌株、PcxSN 植物表达载体和烟草(*Nicotiana tabacum*) NC89 无菌试管苗由本实验室保存。

Xcm I 购自 NEB 公司,2 $\times$ Accurate TaqMaster Mix (dye plus)、SteadyPure 植物 RNA 提取试剂盒和 SYBR Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒购自湖南艾科瑞生物工程有限公司;DNA Ligation Kit Ver. 2.1 和 PrimeScriptTM 逆转录酶购自宝生物工程(大连)有限公司;头孢噻肟钠(cefotaxime sodium)、特泥菌(timentin)、乙酰丁香酮(acetosyringone)、潮霉素 B 溶液(hygromycin B solution)、DNA 胶回收试剂盒、UNIQ-10 柱式质粒小量抽提试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司。菜油甾醇(Lot B0408AS)和谷甾醇(Lot N0615AS)标准品购自上海源叶生物科技有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 *DoSMT2* 基因开放阅读框的克隆 以重组的克隆载体质粒 pMD19-T-*DoSMT2*^[24] 为模板,利用引物 *SMT-F* 和 *SMT-R*(表 1)扩增 *DoSMT2* 基因的开放阅读框。PCR 扩增体系 50 μ L: 质粒 pMD19-T-*DoSMT2* 1 μ L,引物(10 mmol $\cdot$ L⁻¹)各 1 μ L,2 $\times$ Accurate TaqMaster Mix 25 μ L,ddH₂O 22 μ L。PCR 反应程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,58 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳验证后,胶回收目的片段。

1.2.2 植物表达载体的构建 植物表达载体 pCX-SN 经 *Xcm* I 酶切,酶切产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳验证后,胶回收载体片段。回收产物与 *DoSMT2* 基因的胶回收产物在 16 $^{\circ}$ C 连接 2 h,连接

体系 10 μL ;pCXSN 酶切回收产物 2 μL 、DoSMT2 基因胶回收产物 3 μL 、Solution I 5 μL 。连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞后,在 105 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下振荡培养 1 h 后,菌液涂布于含卡那霉素 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 LB 固体培养基上,37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养过夜。挑取单克隆在含卡那霉素 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的液体 LB 培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养过夜。提取经 PCR 鉴定为阳性克隆的质粒,委托生工生物工程(上海)有限公司测序,通过序列比对获得重组的正义植物表达载体质粒 pCXSN-DoSMT2(图 1)。

1.2.3 农杆菌介导重组质粒 pCXSN-DoSMT2 遗传转化烟草 采用“冻融法”将重组正义植物表达载体质粒 pCXSN-DoSMT2 导入农杆菌 EHA105 中。利用农杆菌介导的烟草叶盘转化法^[25],将 pCXSN-DoSMT2 基因遗传转化烟草,获得抗潮霉素的抗性转化植株。烟草转化植株种植于温室大棚。

表 1 PCR 引物

Table 1 PCR primers

引物 Primer	序列 Sequence (5'→3')
SMT-F	CCGGAATTCATGGATACGGCTGCGCTGCT
SMT-R	CCGCTCGAGCTCGCCTCCATACTATGAGC
Hpt1	GATGTTGGCGACCTCGTATT
Hpt2	TCGTTATGTTTATCGGCACTTT
SMTBolt-F	TTTCTTATGAATGGGTTACGACTG
SMTBolt-R	AATTGGCTTGCGGCAGAGT
SMT2-F	TCAACGAGTACCAGGTCAGC
SMT2-R	TAGCCTCGATTGAGTAAGCC
NtACT-F	ATCCTCGCATCCCTTAGCAC
NtACT-R	GCCCCACCTTCAAAGACTCC

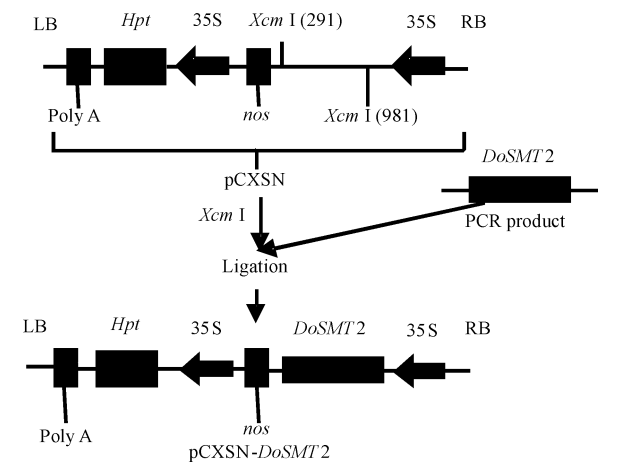


图 1 植物表达载体 pCXSN-DoSMT2 的构建
Fig. 1 Construction of plant expression vector pCXSN-DoSMT2

1.2.4 转基因烟草的分子检测 以 CTAB 法提取的烟草抗性转化植株叶片基因组 DNA 为模板,用引物 Hpt1 和 Hpt2 进行 PCR 扩增潮霉素基因片段,筛选抗性转化植株,产物长度为 517 bp。用引物 SMTBolt-F 和 SMTBolt-R 进行 PCR 法制备地高辛标记探针,经 PCR 检测为阳性的烟草植株基因组 DNA 用 Hind III 酶切后用于 Southern blot。Southern blot 委托生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

用 SteadyPure 植物 RNA 提取试剂盒提取转 DoSMT2 基因烟草叶片总 RNA,用 PrimeScriptTM 逆转录酶合成 cDNA 第 1 链。将合成的 cDNA 第 1 链浓度定量为 200 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,以烟草 Actin 基因作为内参基因,根据 SYBR Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒的说明书进行实时荧光定量 PCR 扩增(Roche LightCycler 96),检测外源 DoSMT2 基因在不同转基因烟草中的表达情况。DoSMT2 基因引物为 SMT2-F 和 SMT2-R,烟草 Actin 基因引物为 NtACT-F 和 NtACT-R。

1.2.5 转基因烟草植物甾醇含量测定 转基因烟草叶片菜油甾醇和谷甾醇的含量委托青岛科创质量检测有限公司测定,参考李涛等^[26]的方法。

1)样品前处理 取 0.5 g 转基因烟草叶片粉末,于取样瓶中,以非转基因烟草叶片为对照,加入 5 mL 二氯甲烷,超声波萃取 20 min,6 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,分离取出二氯甲烷,再加入 5 mL 二氯甲烷超声波萃取 10 min,离心分离取出二氯甲烷,合并 2 次萃取液,用二氯甲烷定容至 10 mL,过 0.45 μm 滤膜后,进样分析。

2)色谱条件 Thermo TG-5 MS 色谱柱(30 $\text{m} \times 0.25 \text{ mm} \times 0.25 \mu\text{m}$),进样量 2 μL ;升温程序:80 $^{\circ}\text{C}$ 保持 2 min,以 20 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速率升温至 300 $^{\circ}\text{C}$,保持 15 min;进样口温度为 300 $^{\circ}\text{C}$;载气为 He,载气流速为 0.8 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$;分流比为 40 : 1。

3)质谱条件 离子源温度 200 $^{\circ}\text{C}$,传输线温度 250 $^{\circ}\text{C}$,溶剂延迟时间 3.00 min,扫描范围 30~450 m/z ,离子源为 EI 源 70 eV。

1.3 数据处理

方差分析采用 DPS 软件^[27],差异显著性用最小显著差数法(LSD)进行平均数的多重比较。

2 结果与分析

2.1 DoSMT2 基因开放阅读框克隆

以重组克隆载体质粒 pMD19-T-DoSMT2 为

模板,利用引物 *SMT-F* 和 *SMT-R* 扩增 *DoSMT2* 基因的开放阅读框,扩增产物在 1 119 bp 处有 1 条特异性条带(图 2),胶回收目的条带,获得 *DoSMT2* 基因的开放阅读框。

2.2 植物表达载体的构建与鉴定

胶回收 *XcmI*酶切后植物表达载体 pCXS_N 片段,与 *DoSMT2* 基因胶回收产物连接后转化 DH5 α 感受态细胞,挑取单克隆于含有 100 mg · L⁻¹ 卡那霉素的液体 LB 培养基扩繁,经菌液 PCR 鉴定(图 3)后,提取阳性克隆菌株的质粒并进行测序,通过序列比对分析,获得正义植物表达载体质粒 pCXS_N-*DoSMT2*。

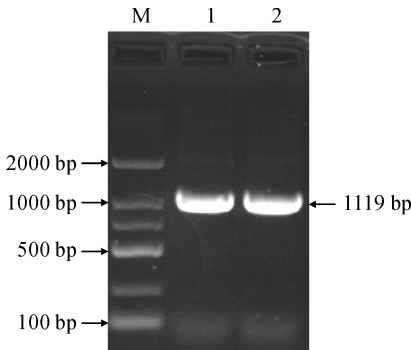
2.3 转基因烟草基因组 DNA 的 PCR 检测

利用农杆菌介导的烟草叶盘转化法将重组正义植物表达载体 pCXS_N-*DoSMT2* 遗传转化烟草,通过潮霉素抗性筛选,共获得 6 株抗潮霉素烟草植株。提取 6 株抗潮霉素烟草植株基因组 DNA,以 *Hpt1* 和 *Hpt2* 作为引物,PCR 扩增潮霉素基因片段。其中 4 株能扩增到 1 条 517 bp 特异条带(图 4),分别

用代号 P1、P2、P3 和 P4 表示。以 4 株能扩增到潮霉素基因片段的烟草植株基因组 DNA 为模板,以 *SMT-F* 和 *SMT-R* 为引物,扩增 *DoSMT2* 基因,4 株转基因烟草植株在 1 119 bp 处能扩增出 1 条特异条带(图 5),而非转基因植株没有该条带,说明外源 *DoSMT2* 基因已经整合到烟草基因组中。

2.4 转 *DoSMT2* 基因烟草基因组 DNA 的 Southern blot 检测

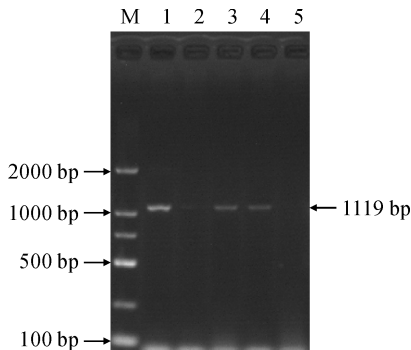
经过潮霉素基因和 *DoSMT2* 基因的 PCR 检测为阳性的 4 株转基因烟草植株和非转基因烟草植株的基因组 DNA 用 *Hind* III 酶切,以 DIG 标记的 *DoSMT2* 基因为探针进行 Southern 杂交,以 pMD19-T-*DoSMT2* 为阳性对照。结果表明,4 株转基因烟草植株都有 1 条杂交信号带,非转基因烟草植株没有杂交信号带(图 6),说明外源 *DoSMT2* 基因都以单拷贝整合到 4 株转基因烟草基因组中。



M. DL2000; 1-2. *DoSMT2*

图 2 *DoSMT2* 基因开放阅读框 PCR 产物电泳

Fig. 2 PCR product electrophoresis of *DoSMT2* gene ORF

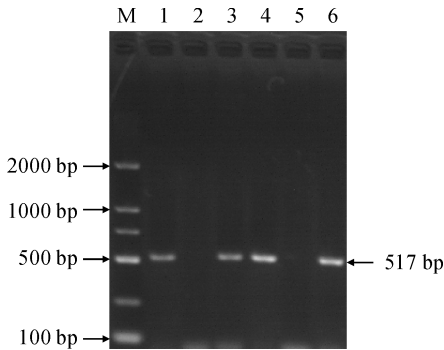


M. DL2000; 1,3,4. *DoSMT2*; 2,5. 阴性克隆

图 3 重组质粒 pCXS-*DoSMT2* 的 PCR 检测

M. DL2000; 1, 3, 4. *DoSMT2*; 2, 5. Negative clone

Fig. 3 PCR detection of recombinant plasmid pCXS-*DoSMT2*

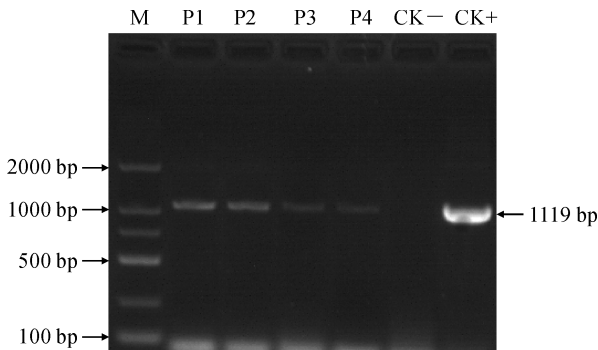


M. DL2000; 1-6. 潮霉素抗性植株

图 4 潮霉素基因片段的 PCR 检测

M. DL2000; 1-6. Hygromycin resistant plantlet

Fig. 4 PCR detection of hygromycin gene fragment



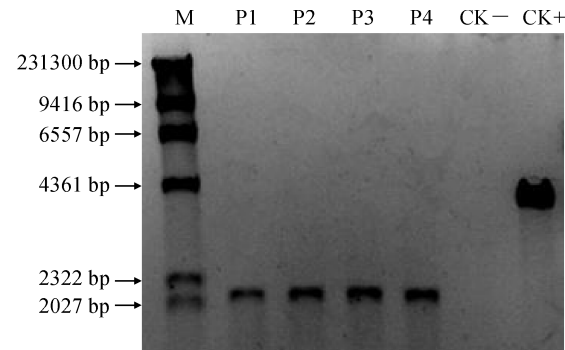
M. DL2000; P1-P4. 潮霉素抗性植株; CK-, 非转基因植株; CK+, pMD19-T-*DoSMT2*

图 5 *DoSMT2* 基因的 PCR 检测

M. DL2000; P1-P4. Hygromycin resistant tobacco;

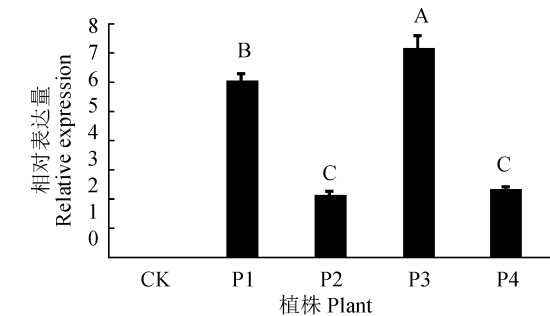
CK-, Non-transgenic tobacco; CK+, pMD19-T-*DoSMT2*

Fig. 5 PCR detection of *DoSMT2* gene



M. DNA 分子量标记Ⅱ；P1—P4. 转基因烟草植株；
CK—. 非转基因烟草植株；CK+. pMD19-T-*DoSMT2*
图 6 转 *DoSMT2* 基因烟草植株的 Southern blot 杂交结果
M. DNA molecular-weight marker Ⅱ；P1—P4. Transgenic tobacco；CK—. Non-transgenic tobacco；
CK+. pMD19-T-*DoSMT2*

Fig. 6 Southern blot of transgenic tobacco with *DoSMT2* gene



CK. 非转基因烟草；P1—P4. 转基因烟草；柱上不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)。下同

图 7 *DoSMT2* 基因在转基因烟草叶片中的表达分析
CK. Non-transgenic tobacco；P1—P4. Transgenic tobacco；
Different capital letters upon column indicate significant difference at 0.01 level. The same as below

Fig. 7 Expression of *DoSMT2* gene in leaves of transgenic tobacco

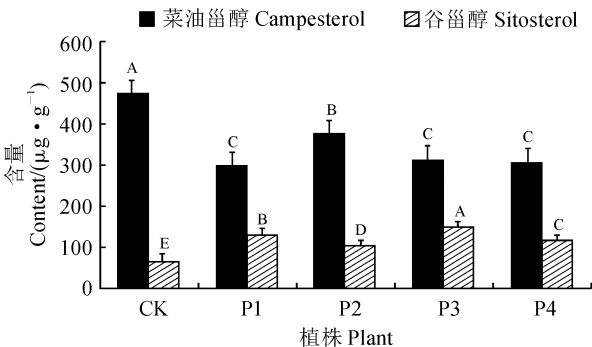


图 8 转基因烟草叶片菜油甾醇和谷甾醇含量
Fig. 8 Contents of campesterol and sitosterol in transgenic tobacco leaves

2.5 转基因烟草 *DoSMT2* 基因表达分析

以烟草 *Actin* 基因为内参基因,利用 qRT-PCR 技术检测 *DoSMT2* 基因在 4 株转基因烟草叶片中的表达情况。结果表明(图 7),非转基因烟草未检测到外源 *DoSMT2* 基因表达,4 株转基因烟草都能检测到 *DoSMT2* 基因的表达,表达水平差异达到极显著。其中表达量最高的是 P3 株,其次是 P1 株, P2 和 P4 株的表达差异不显著。

2.6 转基因烟草叶片菜油甾醇和谷甾醇含量测定

对 4 株转 *DoSMT2* 基因烟草叶片菜油甾醇和谷甾醇的含量进行测定,结果表明(图 8),4 株转 *DoSMT2* 基因烟草叶片的菜油甾醇含量极显著低于非转基因烟草叶片,其中 P1、P3 和 P4 之间差异不显著,但极显著低于 P2;4 株转 *DoSMT2* 基因烟草叶片的谷甾醇的含量都极显著高于非转基因烟草叶片,且 4 株之间也都存在极显著差异,含量从高到低依次为 $P3 > P1 > P4 > P2$ 。

3 讨论

植物甾醇是生物膜的组成成分,具有调节膜流动性和渗透性的作用。甾醇 C-24 甲基转移酶(sterol C-24-methyltransferase; SMT)分为 SMT1 和 SMT2 两个家族。SMT1 催化 C-24 位的第一次甲基化,完成甲基从 S-腺苷甲硫氨酸到环阿屯醇的转移,形成 C-24 甲基基环阿屯醇,SMT2 催化 C-24 位的第二次甲基化,形成 24-亚乙基胆甾烯醇^[28]。

SMT2 位于植物甾醇合成途径中甲基甾醇和乙基甾醇的一个分支点。已有研究结果表明,以 CaMV 35S 或 TET1 作为组成型启动子,利用根癌农杆菌把拟南芥 *SMT2* 基因转化烟草,对转基因烟草叶片甾醇测定发现,菜油甾醇的含量下降,同时谷甾醇的含量增加,其他甲基甾醇、乙基甾醇和总甾醇含量与对照差异不大,说明 *SMT2* 基因主要调节植物细胞中甲基甾醇菜油甾醇和乙基甾醇谷甾醇的含量和比例,不改变植物细胞中总甾醇的含量^[29-31]。因此,通过检测转基因植株中菜油甾醇和谷甾醇含量的变化,可以验证 *SMT2* 基因的功能。本研究以 CaMV 35S 作为组成型启动子,通过根癌农杆菌介导,把 *DoSMT2* 基因遗传转化烟草,经过基因组水平检测,获得了 4 株在组成型启动子 CaMV 35S 控制下的转 *DoSMT2* 基因烟草植株。qRT-PCR 技术检测表明,*DoSMT2* 基因在 4 株转基因烟草叶片中都有表达,且表达量存在极显著的差异。通过分析转基因烟草叶片菜油甾醇和谷甾醇的含量发现,

DoSMT2 基因在烟草叶片中的表达量与菜油甾醇含量呈负相关,与谷甾醇含量呈正相关。转基因烟草植株叶片菜油甾醇含量是非转基因烟草的 0.62~0.79 倍,极显著降低,谷甾醇含量是非转基因烟草的 1.54~2.22 倍,极显著升高。

参考文献:

[1] RUDKOWSKA I. Plant sterols and stanols for healthy ageing [J]. *Maturitas*, 2010, **66**(2): 158-162.

[2] 吴时敏, 吴谋成, 马莉. 植物甾醇在菜籽高级烹调油中的抗氧化作用(Ⅱ)——高温下抗氧化作用的研究[J]. *中国油脂*, 2003, **28**(5): 32-33.

WU S M, WU M C, MA L. Antioxidant effect of phytosterols in high grade rapeseed cooking oil(Ⅱ)—antioxidant effect at high temperature[J]. *China Oils and Fats*, 2003, **28**(5): 32-33.

[3] 曹玫, 欧阳露. 植物甾醇的抗肿瘤作用及其机制研究进展[J]. *实用药物与临床*, 2015, **18**(9): 1 104-1 107.

CAO M, OUYANG L. Study on development of anti-tumor effect of phytosterols[J]. *Practical Pharmacy and Clinical Remedies*, 2015, **18**(9): 1 104-1 107.

[4] 耿敬章, 梁加敏, 许璐璐, 等. 植物甾醇的生理功能及其开发前景[J]. *饮料工业*, 2015, **18**(5): 70-73.

GENG J Z, LIANG J M, XU L L, *et al.* The physiological functions of phytosterol and its development prospects[J]. *Beverage Industry*, 2015, **18**(5): 70-73.

[5] 林江波, 王伟英, 邹晖, 等. 植物甾醇生物合成与关键酶基因研究进展[J]. *农业科学*, 2018, (3): 5-7.

LIN J B, WANG W Y, ZOU H, *et al.* Research progress in biosynthesis and key synthase gene of phytosterol [J]. *Agricultural Science*, 2018, (3): 5-7.

[6] 周海玥, 汤威, 姜婧, 等. β -谷甾醇与豆甾醇对非酒精性脂肪肝作用的体外研究[J]. *营养学报*, 2016, **38**(5): 456-461.

ZHOU H Y, TANG W, JIANG J, *et al.* Effects of β -sitosterol and stigmasterol on non-alcoholic fatty liver disease *in vitro* [J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2016, **38**(5): 456-461.

[7] 张硕, 岳旺, 王蕾, 等. 白花蛇舌草豆甾醇对肝癌细胞的体内外抑制作用及对其增殖周期、凋亡的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2008, **8**(11): 2 016-2 017.

ZHANG S, YUE W, WANG L, *et al.* Inhibitive effect of stigmasterol from *Hedyotis diffusa* Willd. on hepatoma cells *in vitro* & *in vivo* and its influence on transplanted H22 tumor cell's multiplication cycle, apoptosis[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2008, **8**(11): 2 016-2 017.

[8] 周玲玉, 徐彩, 王乐琴, 等. β -谷甾醇对人肺癌 A549 细胞增殖及凋亡的影响[J]. *国际检验医学杂志*, 2016, **37**(7): 865-867.

ZHOU L Y, XU C, WANG L Q, *et al.* Effect of β -sitosterol

综上所述, *DoSMT2* 具有催化 24-亚甲基胆甾烯醇合成 24-亚乙基胆甾烯醇的酶活性。本研究结果为后续调控铁皮石斛植物甾醇生物合成及开发利用铁皮石斛叶片植物甾醇打下了基础。

on proliferation and apoptosis of lung cancer cell line A549[J]. *International Journal of Laboratory Medicine*, 2016, **37**(7): 865-867.

[9] BENVENISTE P. Biosynthesis and accumulation of sterols [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2004, 55: 429-457.

[10] GREBENOK R J, GALBRAITH D W, DELLA PENNA D. Characterization of *Zea mays* endosperm C-24 sterol methyltransferase: One of two types of sterol methyltransferase in higher plants[J]. *Plant Molecular Biology*, 1997, **34**(6): 891-896.

[11] 关红雨, 苏平, 赵瑜君, 等. 雷公藤甾醇 C-24 甲基转移酶(TwSMT2)的 cDNA 克隆及表达分析[J]. *药学报*, 2016, **51**(11): 1 799-1 805.

GUAN H Y, SU P, ZHAO Y J, *et al.* Cloning and protein expression of sterol-C-24-methyl transferase 2 in *Tripterygium wilfordii* [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2016, **51**(11): 1 799-1 805.

[12] NEELAKANDAN A K, SONG Z H, WANG J Q, *et al.* Cloning, functional expression and phylogenetic analysis of plant sterol 24C-methyltransferases involved in sitosterol biosynthesis[J]. *Phytochemistry*, 2009, **70**(17/18): 1 982-1 998.

[13] LUO M, TAN K L, XIAO Z Y, *et al.* Cloning and expression of two sterol C-24 methyltransferase genes from upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2008, **35**(6): 357-363.

[14] 唐丽, 李菁, 龙华, 等. 不同生长龄铁皮石斛茎与叶中总多糖、总生物碱及总黄酮含量的差异[J]. *广东农业科学*, 2015, **42**(8): 17-21.

TANG L, LI J, LONG H, *et al.* Content differences of total polysaccharides, total alkaloids and total flavonoids from stems and leaves of *Dendrobium candidum* at different growth ages[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2015, **42**(8): 17-21.

[15] 董伟, 何春梅, 俞振明, 等. 铁皮石斛醇溶性浸出物和 6 类物质的动态变化研究[J]. *热带亚热带植物学报*, 2017, **25**(4): 370-378.

DONG W, HE C M, YU Z M, *et al.* Dynamic changes in alcohol soluble components and six kinds of substances from *Dendrobium officinale* [J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2017, **25**(4): 370-378.

[16] 杨柳, 刘守金, 胡江苗, 等. GC-MS 法检测铁皮石斛茎中挥发性成分[J]. *中国现代中药*, 2013, **15**(5): 362-364.

YANG L, LIU S J, HU J M, *et al.* Determination of volatile components from stem of *Dendrobium officinale* by GC-MS[J]. *Modern Chinese Medicine*, 2013, **15**(5): 362-364.

[17] 陈晓梅, 杨峻山, 郭顺星, 等. 固体培养铁皮石斛原球茎化学成分研究[J]. 中国现代中药, 2014, **16**(4): 265-268.

CHEN X M, YANG J S, GUO S X, *et al.* Studies on the chemical constituents of solid cultured *Dendrobium officinale* protocorms[J]. *Modern Chinese Medicine*, 2014, **16**(4): 265-268.

[18] 全晶晶, 虞泓, 曾文波, 等. 6个不同产地铁皮石斛功效成分的分析研究[J]. 云南中医学院学报, 2017, **40**(5): 81-84.

TONG J J, YU H, ZENG W B, *et al.* Study on functional components of *Dendrobium officinale* from different culturing areas[J]. *Journal of Yunnan University of Traditional Chinese Medicine*, 2017, **40**(5): 81-84.

[19] 廖俊杰, 李文静, 李进进, 等. 铁皮石斛有效成分与功效研究进展[J]. 广东轻工职业技术学院学报, 2015, **14**(3): 16-19.

LIAO J J, LI W J, LI J J, *et al.* Advances in the of constituents and pharmacological effects of *Dendrobium candidum* Wall. ex. Lind. [J]. *Journal of Guangdong Industry Technical College*, 2015, **14**(3): 16-19.

[20] 施仁潮, 竹剑平, 李明焱. 铁皮石斛抗肿瘤作用的研究进展[J]. 中国药学杂志, 2013, **48**(19): 1 641-1 644.

SHI R C, ZHU J P, LI M Y. Research progress of anti-tumor effect of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo. [J]. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 2013, **48**(19): 1 641-1 644.

[21] 吕圭源, 颜美秋, 陈素红. 铁皮石斛功效相关药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2013, **38**(4): 489-493.

LÜ G Y, YAN M Q, CHEN S H. Review of pharmacological activities of *Dendrobium officinale* based on traditional functions[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2013, **38**(4): 489-493.

[22] 吴蓓丽, 吴月国, 赵铮蓉, 等. 铁皮石斛免疫调节作用及相关活性成分多糖的研究进展[J]. 中草药, 2019, **50**(21): 5 373-5 379.

WU B L, WU Y G, ZHAO Z R, *et al.* Advances in immunoregulatory effects and bioactive compounds of polysaccharides from *Dendrobium officinale* [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2019, **50**(21): 5 373-5 379.

[23] 林江波, 王伟英, 邹晖, 等. 基于转录组测序的铁皮石斛植物甾醇生物合成相关基因分析[J]. 热带亚热带植物学报, 2019, **27**(6): 693-701.

LIN J B, WANG W Y, ZOU H, *et al.* Analysis of related genes in phytosterol biosynthesis in *Dendrobium officinale* based on transcriptome sequencing technology[J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2019, **27**(6): 693-701.

[24] 林江波, 王伟英, 邹晖, 等. 铁皮石斛 DoSMT2 基因的克隆与表达分析[J]. 热带亚热带植物学报, 2020, **28**(6): 591-598.

LIN J B, WANG W Y, ZOU H, *et al.* Cloning and expression analysis of DoSMT2 gene in *Dendrobium officinale* [J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2020, **28**(6): 591-598.

[25] 王伟英, 李海明, 戴艺民, 等. 中国水仙 *NtPLATZ1* 正、反义植物表达载体构建及转化烟草的研究[J]. 园艺学报, 2017, **44**(12): 2 399-2 407.

WANG W Y, LI H M, DAI Y M, *et al.* Research on construction of sense and antisense plant expression vectors of *NtPLATZ1* gene in *Narcissus tazetta* var. *chinensis* and genetic transformation to tobacco plants[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2017, **44**(12): 2 399-2 407.

[26] 李涛, 李琪, 林丽云, 等. 气相色谱-质谱法测定热带水果中植物甾醇的含量[J]. 热带作物学报, 2018, **39**(12): 2 486-2 490.

LI T, LI Q, LIN L Y, *et al.* Analysis the phytosterols of tropical fruits by gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2018, **39**(12): 2 486-2 490.

[27] 唐启义, 冯明光. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统[M]. 北京: 科学出版社, 2002.

[28] BOUVIER-NAVÉ P, HUSSELSTEIN T, BENVENISTE P. Two families of sterol methyltransferases are involved in the first and the second methylation steps of plant sterol biosynthesis[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1998, **256**(1): 88-96.

[29] SCHALLER H, BOUVIER-NAVÉ P, BENVENISTE P. Overexpression of an *Arabidopsis* cDNA encoding a sterol-C24¹-methyltransferase in tobacco modifies the ratio of 24-methyl cholesterol to sitosterol and is associated with growth reduction[J]. *Plant Physiology*, 1998, **118**(2): 461-469.

[30] SITBON F, JONSSON L. Sterol composition and growth of transgenic tobacco plants expressing type-1 and type-2 sterol methyltransferases[J]. *Planta*, 2001, **212**(4): 568-572.

[31] SCHAEFFER A, BOUVIER-NAVÉ P, BENVENISTE P, *et al.* Plant sterol-C24-methyl transferases: Different profiles of tobacco transformed with SMT1 or SMT2 [J]. *Lipids*, 2000, **35**(3): 263-269.

(编辑:宋亚珍)