



铁皮石斛*DoSMT2*基因的克隆与表达分析

林江波, 王伟英, 邹晖, 戴艺民

引用本文:

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.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11926/jtsb.4234>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

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

Analysis of Related Genes in Phytosterol Biosynthesis in *Dendrobium officinale* Based on Transcriptome Sequencing Technology
热带亚热带植物学报. 2019, 27(6): 693–701 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4025>

铁皮石斛体细胞胚胎发生类受体激酶基因*DoSERK*的克隆和表达分析

Cloning and Expression Analysis of Somatic Embryogenesis Receptor Kinase Gene (*DoSERK*) from *Dendrobium officinale* Kimura et Migo
热带亚热带植物学报. 2015(5): 518–526 <https://doi.org/10.11926/j.issn.1005-3395.2015.05.006>

麻竹同源异型盒基因*DIKNOX*的克隆及表达分析

Cloning and Expression Analysis of *DIKNOX* Gene from Bamboo (*Dendrocalamus latiflorus*)
热带亚热带植物学报. 2016, 24(6): 649–656 <https://doi.org/10.11926/j.issn.1005-3395.2016.06.008>

蔓花生*PEPC*基因家族的生物信息学分析

Bioinformatics Analysis of *PEPC* Gene Family in *Arachis duranensis*
热带亚热带植物学报. 2018, 26(2): 107–115 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3804>

瘤菌根菌对铁皮石斛根系形态的影响及其共生关系的研究

Effect of *Epulorhiza* sp. on Root Morphology of *Dendrobium officinale* and Their Symbiotic Relationship
热带亚热带植物学报. 2020, 28(2): 124–130 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4093>

铁皮石斛 *DoSMT2* 基因的克隆与表达分析

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: 为了解 *SMT2* 基因在铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)甾醇代谢过程中的作用, 利用 RACE 技术克隆到 1 个 *DoSMT2* 基因, 开放阅读框为 1 089 bp, 编码 362 个氨基酸, *DoSMT2* 相对分子量为 40.345 kD, 理论等电点为 8.13, 属于稳定的亲水性蛋白。经 BLAST P 检索, *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。系统进化分析表明, *DoSMT2* 与深圳拟兰(*Apostasia shenzhenica*)的 *SMT2* 亲缘关系最近, 确定其属于 *SMT2* 家族。qRT-PCR 分析结果表明, *DoSMT2* 基因在茎和叶都能表达, 10 月份的表达量最高, 叶片的表达量显著高于茎, 推断叶片的甾醇代谢比茎活跃。构建了 pET-29a-*DoSMT2* 原核表达载体, 并转化大肠杆菌 BL21(DE3), IPTG 诱导表达出预期大小的蛋白。这为铁皮石斛 *DoSMT2* 的甲基化机制及甾醇化合物代谢研究奠定基础。

关键词: 铁皮石斛; 甾醇 C-24 甲基转移酶; 原核表达; 荧光定量 PCR

doi: 10.11926/jtsb.4234

Cloning and Expression Analysis of *DoSMT2* Gene in *Dendrobium officinale*

LIN Jiang-bo, WANG Wei-ying, ZOU Hui, DAI Yi-min*

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

Abstract: In order to understand the function of *SMT2* gene in sterol metabolism of *Dendrobium officinale*, *DoSMT2* gene was cloned by RACE. The results showed that the full length of *DoSMT2* gene was 1 446 bp with an ORF of 1 089 bp, encoding a protein of 362 amino acids. The *DoSMT2* had relative molecular weight of 40.345 kD, and the theoretical isoelectric of 8.13, showing a stable hydrophilic protein. Retrieved by BLAST P, the *DoSMT2* protein belonged to the AdoMet-MTases superfamily, containing four S-adenosylmethionine binding sites, one methyltransferase domain and one sterol methyltransferase C-terminal domain. The *DoSMT2* was closely homologous to the *SMT2* of *Apostasia shenzhenica* (PKA61629.1) by phylogenetic analysis, belonging to *SMT2* family. The *DoSMT2* gene was expressed in both stems and leaves by using qRT-PCR. The expression of *DoSMT2* gene in October was the highest, and that in leaf was significantly higher than that in stem, it was suggested that sterol metabolism in leaves was more active than that in stems. The prokaryotic expression vector pet-29a-*DoSMT2* was constructed and transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3). The recombinant protein was expressed after IPTG induction. Therefore, these would provide the foundation for studies on the methylation mechanism of *DoSMT2* and sterol metabolism of *D. officinale*.

Key words: *Dendrobium officinale*; Sterol-C-24-methyl transferase; Prokaryotic expression; qRT-PCR

植物甾醇是以环戊烷多氢菲组成的 4 个环为主要骨架的 3-羟基碳氢化合物^[1], 不仅具有抗氧化和

延缓衰老的功能^[2-3], 还可通过抑制肿瘤细胞生长和转移, 改变信号传导, 诱导细胞凋亡, 刺激产生

收稿日期: 2020-04-17

接受日期: 2020-05-06

基金项目: 福建省自然科学基金面上项目(2018J01119)资助

This work was supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province (Grant No. 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 Corresponding author. E-mail: dymtcn@163.com

肿瘤免疫应答等作用机制,对多种肿瘤的发生和发展起到预防和治疗作用^[4-7],是一类对人体非常有益的植物活性成分。

铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)是名贵的传统中药材,具有益胃生津、滋阴清热、抗疲劳、提高免疫力、抗肿瘤等效果^[8-9]。甾醇类物质是铁皮石斛的有效成分之一,已经从铁皮石斛干燥茎中检测到豆甾醇、22,23-二氢豆甾醇、 β -谷甾醇、 γ -谷甾醇和油菜甾醇等植物甾醇,不同产地的铁皮石斛甾醇含量存在差异^[10-11]。

植物甾醇的上游生物合成途径与三萜类化合物一致,2个分子的法尼基焦磷酸在鲨烯合酶(squalene synthase, SQS)、鲨烯环氧酶(squalene epoxidase, SE)的催化下生成 2,3-氧化鲨烯,环阿屯醇合酶(cycloartenol synthase, CAS)催化 2,3-氧化鲨烯生成环阿屯醇,代谢流往甾醇方向^[12-13]。根据侧链 C-24 位上烷基的有无植物甾醇可分为无烷基甾醇、甲基甾醇和乙基甾醇 3 类。甾醇 C-24 甲基转移酶(sterol C-24-methyltransferase, SMT)修饰甾醇侧链 C-24 位,根据其功能分为 2 个家族 SMT1 和 SMT2。SMT1 把 1 个甲基从 S-腺苷甲硫氨酸转移到环阿屯醇的 C-24 位上,形成 C-24 甲基环阿屯醇,进而形成 C-24 甲基甾醇, SMT2 催化 24-亚甲基甾醇形成 24-亚乙基甾醇,产生新分支 24-乙基甾醇^[14-16]。SMT2 是乙基甾醇合成限速酶,目前,已经从雷公藤(*Tripterygium wilfordii*)^[17]、大豆(*Glycine max*)^[18]、陆地棉(*Gossypium hirsutum*)^[19]等植物中克隆了 SMT2 基因,但有关铁皮石斛 SMT2 基因的研究还未见报道。

本课题组通过转录组测序,对铁皮石斛植物甾醇的生物合成途径和相关基因进行分析^[20],从转录组数据中获得 1 条带 5'末端的铁皮石斛甾醇 C-24 甲基转移酶基因(*DoSMT2*)片段。本研究通过 3'RACE 技术克隆基因全长 cDNA 序列,对其编码的蛋白进行生物信息学、系统进化和原核表达分析,运用荧光定量 PCR 分析该基因在不同组织的表达模式,为进一步研究铁皮石斛 *DoSMT2* 基因功能,甲基化机制及甾醇化合物代谢途径改良奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)采自冠豸山崖

壁,种植于福建省农业科学院亚热带农业研究所资源圃。于 2018 年 8、10、12 月取当年生茎和叶片用液氮速冻后,置于-70℃冰箱中保存,用于 *DoSMT2* 基因的克隆和组织表达特性分析。试验 3 次重复。

大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 DH5 α 、BL21 (DE3)和原核表达载体 pET-29a 由本实验室保存。克隆载体 pMD19-T、T₄ DNA 连接酶、RNAiso Plus、PrimeScript™ Reverse Transcriptase 和 TaKaRa TB Green™ Premix Ex Taq™ II (TliRNaseH Plus)购自宝生物工程(大连)有限公司。DNA 胶回收试剂盒、Dia Spin 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒和 SanTaq PCR Mix 购自上海生工生物工程技术有限公司。

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 第 1 链合成

利用 RNAiso Plus 提取铁皮石斛的总 RNA,用超微量紫外可见光分光光度计(ND-1000)分析 RNA 的质量和浓度,然后按照 PrimeScript™ Reverse Transcriptase 说明书,用随机引物进行 cDNA 第 1 链的合成。取 10 μ L 茎和叶的 cDNA 混合,用于 *DoSMT2* 基因全长 cDNA 和 ORF 的克隆,余下 cDNA 用于 *DoSMT2* 基因表达分析。

1.3 *DoSMT2* 基因的克隆

根据转录组测序获得的 *DoSMT2* 基因片段序列信息设计 3'RACE 引物 3SMT1 和 3SMT2 及接头引物 dT-adaptor 和 adaptor (表 1)。用引物 3SMT1 和 dT-adaptor 进行第一轮 PCR,引物 3SMT2 和 adaptor 进行第二轮 PCR。第一轮 PCR 以混合的 cDNA 为模板,第二轮 PCR 以第一轮 PCR 产物稀释 10 倍为模板。反应体系总体积 25 μ L: 包括 Sterilized ddH₂O 8.5 μ L, 2 \times SanTaq PCR Mix 12.5 μ L, 引物各 1 μ L, 模板 2 μ L。PCR 反应程序为 94℃ 预变性 5 min, 然后 94℃ 变性 30 s, 52℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。第二轮 PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,胶回收目的片段,把目的片段与 pMD19-T 载体连接,连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,复苏后把菌液涂在含 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 平板上,37℃ 倒置培养过夜。挑取单菌落,接种于含 100 mg/L 氨苄青霉素的液体 LB 培养基中过夜培养,利用引物 3SMT2 和 adaptor 进行菌落 PCR,产物经电泳检测,阳性克隆送上海生工生物工程技术有限公司测序。用软件 DNAMAN V 6.0 对测序结果进行拼接和比对。

表 1 PCR 引物

Table 1 PCR primers

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')
3SMT1	GGTGAAGGGAAAACGAGCAGTA	SMT-R	CCGCTCGAGCTCGCCTCCATACATGAGC
3SMT2	TTGGCATCACCATCAACGAGTA	SMT2-F	TCAACGAGTACCAGGTCAGC
dT-adaptor	CTGATCTAGAGGTACCGGATCCTTTTTTTTTTTTTTTT	SMT2-R	TAGCCTCGATTGAGTAAGCC
adaptor	CTGATCTAGAGGTACCGGATCC	DoACT-F	AGGAAGCGCGCTTTGAATC
SMT-F	CCGGAATTCATGGATACGGCTGCGTGCT	DoACT-R	CCATGCCAACCATGACACC

1.4 *DoSMT2* 基因 ORF 的克隆

根据拼接获得的全长 cDNA 序列信息设计引物 SMT-F (带 *EcoR* I 酶切位点) 和 SMT-R (带 *Xho* I 酶切位点), 以 2 μ L 混合的 cDNA 为模板, 用引物 SMT-F 和 SMT-R 进行 PCR 扩增。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 2 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经胶回收, 与 pMD19-T 载体连接、转化、菌落 PCR 验证后, 阳性克隆送去测序。用软件 DNAMAN V 6.0 对测序结果进行比对分析。按 DiaSpin 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒说明提取测序结果经比对正确的阳性克隆的质粒 pMD19-T-*DoSMT2*, -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.5 *DoSMT2* 的生物信息学分析

用 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 在线分析 *DoSMT2* 蛋白质的理化性质。利用在线工具 SPro (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>) 和 SWISS-MODEL (<https://www.swissmodel.expasy.org/>) 预测 *DoSMT2* 蛋白的二级和三级结构。采用 NCBI 的 BLAST P 搜索 *DoSMT2* 的同源蛋白序列和保守结构域, 用 MEGA 6.0 (neighbor joining tree, bootstrap 1 000) 构建系统发育进化树^[21]。

1.6 表达分析

根据 *DoSMT2* 基因全长 cDNA 序列信息设计荧光定量 PCR 引物 SMT2-F 和 SMT2-R。选择铁皮石斛 *Actin* 基因为内参基因, 引物为 DoACT-F 和 DoACT-R, 把 8、10、12 月份采集的铁皮石斛茎和叶总 RNA 逆转录合成的 cDNA, 浓度定量为 200 ng/ μ L。荧光定量 PCR 仪为 Roche LightCycler 96, 操作按照 TaKaRa TB GreenTM Premix Ex TaqTM II (TliRNaseH Plus) 说明书进行。反应体系总体积为 20 μ L: 包括 TB GreenTM Premix Ex TaqTM II (Tli-RNaseH Plus) 10 μ L, 上、下游引物各 1 μ L, cDNA 模板 2 μ L, ddH₂O

补足。反应程序为 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 20 s, 45 个循环; 每处理设置 3 次生物学重复。利用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 法^[22] 计算相对表达量, 方差分析采用 DPS 数据处理软件, 多重比较采用新复极差法 (Duncan's 法), 制图使用 Excel 软件。

1.7 原核表达载体的构建及诱导表达

质粒 pMD19-T-*DoSMT2* 和载体 pET-29a(+) 经 *EcoR* HI 和 *Xho* I 双酶切, 酶切产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 胶回收 *DoSMT2* 基因目的片段和 pET-29a(+) 载体片段。用 T₄ DNA 连接酶连接 *DoSMT2* 基因目的片段和 pET-29a(+) 载体片段, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑取单克隆过夜培养, 菌落 PCR 验证后送去测序。提取阳性克隆的质粒, 获得重组原核表达载体 pET-29a-*DoSMT2*。

用冻融法将 pET-29a-*DoSMT2* 载体转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞, 在含有 100 mg/L 卡那霉素的 LB 平板上倒置培养过夜。挑取单克隆过夜培养, 菌落 PCR 验证后吸取 100 μ L 到 3 mL 含 100 mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 下 200 r/min 振荡培养, 蛋白诱导表达和 SDS-PAGE 电泳参照林江波等^[23] 的方法。

2 结果和分析

2.1 *DoSMT2* 基因的 3'RACE

以随机引物反转录的混合 cDNA 为模板, 利用引物组合 3SMT1、dT-adaptor 和 3SMT2、adaptor 进行两轮 PCR 扩增, PCR 产物经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳, 在 880 bp 左右处有 1 条亮带 (图 1: A), 利用 DNAMAN V 6.0 对测序结果和已经获得的 *DoSMT2* 基因片段进行序列拼接及 ORF 预测分析。结果表明, 获得了全长为 1 446 bp 的 *DoSMT2* 基因 cDNA 序列, ORF 长度为 1 089 bp, 编码 362 个氨基酸, 5' 末端非翻译区 132 bp, 3' 末端非翻译区 225 bp (图 2)。

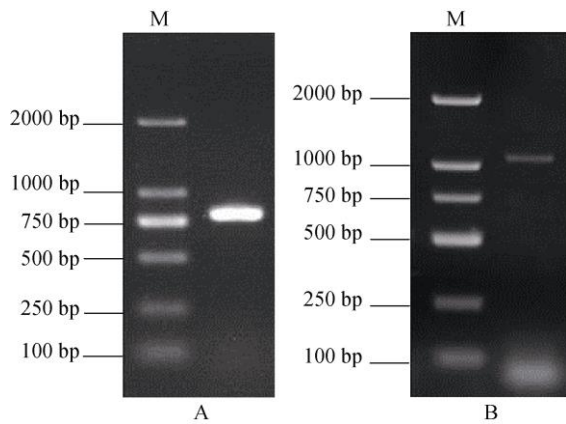


图 1 PCR 产物电泳图。A: 3'RACE; B: 开放阅读框; M: DNA marker。

Fig. 1 Electrophoresis of PCR products. A: 3'RACE; B: ORF; M: DNA marker.

2.2 *DosSMT2* 基因 ORF 的克隆

以随机引物反转录的混合 cDNA 为模板, 利用引物 SMT-F 和 SMT-R 进行 PCR, 扩增 *DoSMT2* 基因 ORF, 从图 1: B 可见, 在 1 089 bp 左右有 1 条亮带, 大小与预测的 *DoSMT2* 基因 ORF 一致。PCR 产物经过克隆及验证后送去测序, 结果表明获得了带 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切位点的 *DoSMT2* 基因 ORF。提取阳性克隆的质粒 pMD19-T-*DoSMT2*, 供后续实验。

2.3 *DoSMT2* 的生物信息学分析

Protparam 在线预测和分析结果表明, *DoSMT2*

蛋白的分子量为 40.345 kD, 理论等电点为 8.13, 负电荷的氨基酸残基数(Asp+Glu)为 42, 正电荷的氨基酸残基数(Arg+Lys)为 44。不稳定系数是 31.28, 脂肪系数是 84.28, 总平均疏水性是-0.143, 属于一种稳定的亲水性蛋白。

采用 SSPro 在线预测 *DoSMT2* 蛋白的二级结构, 结果表明(图 3), 有 136 个氨基酸残基形成无规则卷曲, 占 37.57%; 176 个氨基酸残基形成 α 螺旋, 占 48.62%; 50 个氨基酸残基形成 β 折叠, 占 13.81%。SWISS-MODEL 在线预测 *DoSMT2* 蛋白 3D 结构, 结果见图 4, 以 5gm1.1.A 为同源建模模板, 序列一致性为 28.42%, 建模范围在 63~248 位氨基酸残基。

使用 BLAST P 检索 *DoSMT2* 氨基酸序列的同源性和保守结构域, 结果表明, *DoSMT2* 氨基酸序列与深圳拟兰(*Apostasia shenzhenica*, PKA61629.1)、油棕(*Elaeis guineensis*, XP_010918151.1)、海枣(*Phoenix dactylifera*, XP_008785060.1)等植物的 *SMT2* 氨基酸序列相似度分别为 85%、84%和 85%, 属于 AdoMet-MTases 超级家族, 含有 4 个 S-腺苷蛋氨酸结合位点: VGCGVGG、TI、GNF 和 I 等(图 1), 在第 129~224 位有 1 个甲基转移酶保守结构域, E 值为 1.64×10^{-25} , 在第 292~356 位点有 1 个甾醇甲基转移酶 C 末端保守结构域, E 值为 1.10×10^{-26} 。此外, *DoSMT2* 还含有 3 个底物结合位点(图 1): YEWGW-QGSFHF、YSIEATCH 和 KPGGLYVSYEW^[24]。将

```

1  AGAAGTCGACGCCAGCGATTGGCGTCGACGGAACCTGCGAGAGTGATTCGAGCGCTGTGCCACTCAACCTCTCCATTTCTCTCGCTCGCTGCCACTTCTCCATTCCTTC
121 TGCATTCGACGATGGATACCGCTGCGCTGCTTGCAACGGCGGGGATTTGTCGGCCGGAGTTTGTACTGGTTATATGGGTCATGGCTCCGCGGAGGTGAAGGAAAAACGACAGTA
1  M D T A A L L A T A A V F A A G V L Y W F I V W M G S A E V K G K R A V
241 GATCTCAAGATGGGATCGATCACTAAAGACAAAGTCCAGGACAAATATAAAGTACTGGTCTCTTCCGCGCGCCGAAAGACACCGTTGAGTCTCCGAAAAGGTACCAGCTTCGTG
37  D L K M G S I T K D K V Q D K Y K Q Y W S F F R R P K D T V E S E K V P A F V
361 GACACGTTCTACAACCTCGTCCAGCATCTACGAATGGGGATGGGGCAATCTTCCACTTCTCCCTCCGTCGCAAAACCGCTCCCATCGCGACGCCACTCGAATACACGAAGAAGC
77  D T F Y N L V T D I [Y E W G W G Q S F H F] S P S V P N R S H R D A T R I H E E R
481 GTCGTCGATCTCATTAAAGCAAGTCCCGGGCATCGCATCTAGACGTTGGTTCGCGCGCTCGGGGCCCTATGGGGCCATCGCCGCCGTTCCAGGATCCACCGTCTGGCATCCACCAT
117 V V D L I K A S P G H R I L D [V G C G V G G] P M R A I A A R S G S T V V G I T I
601 AACGAGTACCAGGTACGCCGCGCCGTTACACACAACCGTAAGGCTGGTCTCGAGCGCGCTGCGAAGTGTGTGCGGGAATTTCTTGAGATGTCATTGAGGATTGTAGTTTCGATGGG
157 N E Y Q V S R A R S H N R K A G L D G A C E V V C [G N F] L E M S F E D C S F D G
721 GCTTACTCAATCGAGGCTACTGTGTCAGCTCCGCGCTGGAAGATGTGTATGCTGAGATCTACCGCGTGTAAAGCCTGGGGGACTCTATGTTTCTTATGAATGGGTACGACTGGGCTT
197 A [Y S I E A T C H] A P R L E D V Y A E I Y R V L [K P G G L Y V S Y E W] V T T G L
841 TTTCCGGCCGATGACCCGAAGCATGTGGAACGATTCAGGGGATCGAGCGTGGGACCGCTACCGGGTCTTCGAGCTCAGGATCAGATAGCTGTGTGGCGGAAAGGTGGGGTTGAG
237 F R A D D P K H V E T I Q G I E R G D A L P G L R A Q D Q I A G V A R K V G F E
961 GTTGTGGTGGAGAGATCTAGCACTGCGCGCGGGCGGTGGTGGACCCGCTTAAAGATGGGAGGTTAGCTTATTGGAGGAATCATGACTGGTTTCAGTCAATGACTTTGCTTCGG
277 V V V E R D L A L P P A G P W W T R L K M G R L A Y W R N H V L V S V M T L L R
1 081 CTCGCTCTAAAGGTGTGGTCCAGGTTTCATGAGATGTTGTACGAGACGCGAAGCATCTCACTAATGGTGGCGAGACTGGGATCTTACCCCATCATATGATGACTCGCCGCAAGCCA
317 L A P K G V V E V H E M L Y E T A K H L T N G G E T G I F T P M H M I L C R K P
1 201 ATTGACAAAGCTAGCTCATAGTATGGAGCGGAGTAGAAAATCAAGTTCATGTTTTTTTATCGAATTCATGTTAGTACTGCTGTGTATGTGCTTCCCTTCTCGCATCTTCTGG
357 I D K A S S -
1 321 AAAAAATAGGGTTTGGGGTTTTAATGATGAGAAAAAATAAATTCGGGTAGGTTCTTGTGGTCTTTTATGGCGCATCTAATTTATTGTGAATGACCAAAAAA
1 441 AAAAAA

```

图 2 铁皮石斛 *DoSMT2* 基因 cDNA 序列和推导的氨基酸序列。阴影部分为 S-腺苷蛋氨酸结合位点; 黑色方框部分为底物结合位点。

Fig. 2 cDNA sequence of *DoSMT2* gene and deduced amino acid sequence from *Dendrobium officinale*. Shadows are S-adenosylmethionine binding sites;

Black boxes are substrate binding sites.

现了 1 条约 40.345 kD 的蛋白条带, 表明 *DoSMT2* 基因能在大肠杆菌中有效表达(图 7)。

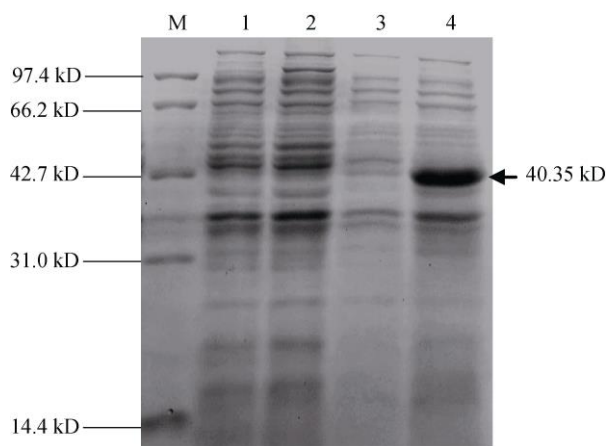


图 7 *DoSMT2* 基因在大肠杆菌中表达的 SDS-PAGE。M: Marker; 1: BL21 未诱导; 2: BL21 诱导; 3: 携带 pET-29a-*DoSMT2* BL21 未诱导; 4: 携带 pET-29a-*DoSMT2* BL21 诱导。

Fig. 7 SDS-PAGE of *DoSMT2* expressed in *Escherichia coli*. M: Marker; 1: Non-induction (BL21); 2: Induction (BL21); 3: Non-induction (BL21 with pET-29a-*DoSMT2*); 4: Induction (BL21 with pET-29a-*DoSMT2*).

3 结论和讨论

本研究从铁皮石斛中克隆到 *DoSMT2* 基因, ORF 长度 1 089 bp, 编码 362 个氨基酸, 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、1 个甾醇甲基转移酶 C 末端保守结构域, 与深圳拟兰、油棕和海枣的 *SMT2* 氨基酸相似度高, 分别为 85%、84% 和 85%, 系统进化分析将其归为 *SMT2* 家族, 与深圳拟兰的亲缘关系最近, 推断其具有甲基化 24-亚甲基胆甾烯醇形成 24-亚乙基胆甾烯醇的酶活性。BOUVIER-NAVE 等^[25]的研究表明, 烟草 *NtSMT2-1* 除了甲基化 24-亚甲基胆甾烯醇活性外, 还有 *SMT1* 甲基化环阿屯醇的功能, 但甲基化 24-亚甲基胆甾烯醇活性是甲基化环阿屯醇活性的 33 倍。本研究把 *DoSMT2* 基因与原核表达载体 pET-29a 连接, 并转化大肠杆菌 BL21, IPTG 成功诱导 BL21 表达出目的蛋白, 为进一步研究 *DoSMT2* 基因的催化功能和甲基化机制奠定基础。

植物甾醇是细胞膜的重要成分, 帮助维持膜的完整性和渗透性^[26]。植物甾醇还可以作为植物体内的信号分子, 参与调节光合作用、生殖和免疫等多

种生理活动^[27]。24-亚甲基甾醇是油菜素甾醇生物合成的前体物质^[28], 含量的变化影响油菜素甾醇生物合成。油菜素甾醇合成缺陷会引起植物矮化^[29], SITBON 等^[30]研究发现烟草 *AtSMT2* 转化株 24-甲基甾醇含量减少, 谷甾醇含量增加, 但总甾醇含量没有明显的变化, 开花期植株矮化, 推测与油菜素甾醇合成的改变有关。铁皮石斛枝条一般 10 月份开始进入封顶期, 停止营养生长。*DoSMT2* 在 10 月份的上调表达, 是否降低了 24-甲基甾醇含量, 引起油菜素甾醇水平下调; 铁皮石斛封顶与油菜素甾醇含量下降之间是否存在关联, 还有待于进一步对铁皮石斛油菜素甾醇代谢的研究来验证。

铁皮石斛叶片约占总生物量的 38%, 功效成分的研究主要集中在多糖和总黄酮等^[31-32], 植物甾醇方面的研究鲜有报道。本研究结果表明叶片的 *DoSMT2* 表达量显著高于茎, 说明叶片植物甾醇代谢比茎活跃, 今后应加强铁皮石斛叶片植物甾醇的研究与开发利用。

参考文献

- [1] ZHANG B, YU T, LI L, et al. Recent advances in plant sterol [J]. Food Ferment Indust, 2015, 41(1): 190-195. doi: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.201501036.
张斌, 郁昕, 栗磊, 等. 植物甾醇的研究进展 [J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(1): 190-195. doi: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.201501036.
- [2] 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]. Chin Oil Fat, 2003, 28(5): 32-33. doi: 10.3321/j.issn:1003-7969.2003.05.012.
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. doi: 10.3321/j.issn:1003-7969.2003.05.012.
- [3] RUDKOWSKA I. Plant sterols and stanols for healthy ageing [J]. Maturitas, 2010, 66(2): 158-162. doi: 10.1016/j.maturitas.2009.12.015.
- [4] 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]. Prog Mod Biomed, 2008, 8(11): 2016-2017, 2009.
张硕, 岳旺, 王蕾, 等. 白花蛇舌草甾醇对肝癌细胞的体内外抑制作用及其增殖周期、凋亡的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(11): 2016-2017, 2009.
- [5] CAO M, OUYANG L. Study on development of anti-tumor effect of phytosterols [J]. Pract Pharm Clin Remed, 2015, 18(9): 1104-1107. doi:

- 10.14053/j.cnki.ppcr.201509026.
- 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): 1104–1107. doi: 10.14053/j.cnki.ppcr.201509026.
- [6] ZHOU L Y, XU C, WANG L Q, et al. Effect of β -sitosterol on proliferation and apoptosis of lung cancer cell line A549 [J]. Int J Lab Med, 2016, 37(7): 865–867. doi: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.07.001.
- 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. doi: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.07.001.
- [7] CHENG X A, ZHOU X W, ZHANG S M, et al. Effects of phytosterol on growth inhibiting and apoptosis induction of melanoma cells [J]. Guangdong Agric Sci, 2014, 41(10): 94–97. doi: 10.3969/j.issn.1004-874X.2014.10.023.
- 程杏安, 周晓武, 张淑明, 等. 植物甾醇对黑色素瘤细胞的生长抑制及凋亡诱导作用 [J]. 广东农业科学, 2014, 41(10): 94–97. doi: 10.3969/j.issn.1004-874X.2014.10.023.
- [8] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China, Volume I [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 282–283.
- 国家药典委员会. 中华人民共和国药典, 一部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 282–283.
- [9] LIAO J J, LI W J, LI J J, et al. Advances in the constituents and pharmacological effects of *Dendrobium candidum* Wall. ex. Lind. [J]. J Guangdong Indust Technol Coll, 2015, 14(3): 16–19, 26. doi: 10.3969/j.issn.1672-1950.2015.03.004.
- 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, 26. doi: 10.3969/j.issn.1672-1950.2015.03.004.
- [10] YANG L, LIU S J, HU J M, et al. Determination of volatile components from stem of *Dendrobium officinale* by GC-MS [J]. Modern Chin Med, 2013, 15(5): 362–364. doi: 10.3969/j.issn.1673-4890.2013.05.003.
- 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. doi: 10.3969/j.issn.1673-4890.2013.05.003.
- [11] TONG J J, YU H, ZENG W B, et al. Study on functional components of *Dendrobium officinale* from different culturing areas [J]. J Yunnan Univ Trad Chin Med, 2017, 40(5): 81–84. doi: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2017.05.018.
- 仝晶晶, 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. doi: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2017.05.018.
- [12] ZHANG X C, HAN Z H. Sterols biosynthesis and their physiological role in plants [J]. Plant Physiol Comm, 2001, 37(5): 452–457.
- 张喜春, 韩振海. 植物体内甾醇的合成和生理作用 [J]. 植物生理学通讯, 2001, 37(5): 452–457.
- [13] LIU Q, CONG L N, ZHANG Z S. Research progress in genetic analysis of the biosynthesis of phytosterols and triterpene saponins [J]. J Anhui Agric Sci, 2006, 34(19): 4844–4846. doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2006.19.012.
- 刘强, 丛丽娜, 张宗申. 植物甾醇与三萜类皂苷生物合成基因调控的研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2006, 34(19): 4844–4846. doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2006.19.012.
- [14] GUAN H Y, SU P, ZHAO Y J, et al. Cloning and functional analysis of two sterol-C24-methyltransferase 1 (*SMT1*) genes from *Paris polyphylla* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2018, 20(7): 595–604. doi: 10.1080/10286020.2016.1271791.
- [15] GUAN H Y, ZHAO Y J, SU P, et al. Molecular cloning and functional identification of sterol C24-methyltransferase gene from *Tripterygium wilfordii* [J]. Acta Pharm Sin B, 2017, 7(5): 603–609. doi: 10.1016/j.apsb.2017.07.001.
- [16] 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. doi: 10.1007/s11745-000-0522-1.
- [17] 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 Pharm Sin, 2016, 51(11): 1799–1805. doi: 10.16438/j.0513-4870.2016-0320.
- 关红雨, 苏平, 赵瑜君, 等. 雷公藤甾醇 C-24 甲基转移酶(*Tw2MT2*)的 cDNA 克隆及表达分析 [J]. 药学学报, 2016, 51(11): 1799–1805. doi: 10.16438/j.0513-4870.2016-0320.
- [18] 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): 1982–1998. doi: 10.1016/j.phytochem.2009.09.003.
- [19] 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]. J Genet Genom, 2008, 35(6): 357–363. doi: 10.1016/S1673-8527(08)60052-1.
- [20] 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]. J Trop Subtrop Bot, 2019, 27(6): 693–701. doi: 10.11926/jtsb.4025.
- 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. doi: 10.11926/jtsb.4025.
- [21] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. *Mol Biol Evol*, 2013, 30(12): 2725–2729. doi: 10.1093/molbev/mst197.
- [22] SCHMITTGEN T D, LIVAK K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method [J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(6): 1101–1108. doi: 10.1038/nprot.2008.73.
- [23] LIN J B, WANG W Y, LI H M, et al. Cloning and expression analysis of *NtPLATZ1* gene from *Narcissus tazetta* var. *chinensis* [J]. *J NW Agric For Univ (Nat Sci)*, 2016, 44(10): 165–170. doi: 10.13207/j.cnki.jnwafu.2016.10.023.
- 林江波, 王伟英, 李海明, 等. 中国水仙锌指蛋白 *NtPLATZ1* 的克隆与表达分析 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2016, 44(10): 165–170. doi: 10.13207/j.cnki.jnwafu.2016.10.023.
- [24] GANAPATHY K, JONES C W, STEPHENS C M, et al. Molecular probing of the *Saccharomyces cerevisiae* sterol 24-C methyltransferase reveals multiple amino acid residues involved with C_2 -transfer activity [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1781(6/7): 344–351. doi: 10.1016/j.bbailip.2008.04.015.
- [25] 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]. *Eur J Biochem*, 1998, 256(1): 88–96. doi: 10.1046/j.1432-1327.1998.2560088.x.
- [26] WEETE J D, PARISH E J, NES W D. Chemistry, biochemistry, and function of sterols [J]. *Lipids*, 2000, 35(3): 241. doi: 10.1007/s11745-000-0517-y.
- [27] GREBE M, XU J, MÖBIUS W, et al. *Arabidopsis* sterol endocytosis involves actin-mediated trafficking via ARA6-positive early endosomes [J]. *Curr Biol*, 2003, 13(16): 1378–1387. doi: 10.1016/S0960-9822(03)00538-4.
- [28] SUN C, LI J. Biosynthesis, catabolism, and signal transduction of brassinosteroids [J]. *Plant Physiol J*, 2017, 53(3): 291–307. doi: 10.13592/j.cnki.ppj.2017.1002.
- 孙超, 黎家. 油菜素甾醇类激素的生物合成、代谢及信号转导 [J]. 植物生理学报, 2017, 53(3): 291–307. doi: 10.13592/j.cnki.ppj.2017.1002.
- [29] CHOE S, DILKES B P, GREGORY B D, et al. The *Arabidopsis dwarf1* mutant is defective in the conversion of 24-methylenecholesterol to campesterol in brassinosteroid biosynthesis [J]. *Plant Physiol*, 1999, 119(3): 897–907. doi: 10.1104/pp.119.3.897.
- [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. doi: 10.1007/s004250000417.
- [31] ZENG X J, SHEN T, HU J X, et al. Characteristics of biomass allocation and polysaccharide content in stem and leaf of different *Dendrobium officinale* strains [J]. *SW China J Agric Sci*, 2018, 31(1): 57–61. doi: 10.16213/j.cnki.scjas.2018.1.010.
- 曾学健, 沈涛, 胡继学, 等. 不同品系铁皮石斛茎叶生物量分配特征及多糖含量比较 [J]. 西南农业学报, 2018, 31(1): 57–61. doi: 10.16213/j.cnki.scjas.2018.1.010.
- [32] HUANG Y C, XIE Z S, REN J, et al. Comparison of HPLC characteristic spectrum of flavonoids on leaves of *Dendrobium officinale* from three provenance sources [J]. *Chin J Exp Trad Med For*, 2015, 21(24): 37–40. doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.2015240037.
- 黄月纯, 谢镇山, 任晋, 等. 3 种种源铁皮石斛叶黄酮类成分 HPLC 特征图谱比较 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(24): 37–40. doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.2015240037.