

DOI:10.11937/bfyy.201708022

# 桂花 *DAD-1* 基因克隆与表达分析

邹晶晶<sup>1</sup>, 陆玲<sup>2</sup>, 曾祥玲<sup>1</sup>, 王彩云<sup>3</sup>

(1. 湖北科技学院 核技术与化学生物学院, 湖北 咸宁 437100; 2. 孝感市农业科学院 蔬菜研究所, 湖北 孝感 432000;  
3. 华中农业大学 园艺植物生物学教育部重点实验室, 湖北 武汉 430070)

**摘要:**以“柳叶金桂”桂花(*Osmanthus fragrans* ‘Liuye Jingui’)为试材,采用 TAIL-PCR 技术,克隆了“柳叶金桂”花瓣中 *DAD-1* 基因的全长序列,并分析了其在桂花不同组织部位及开花阶段的时空表达模式,以期研究该基因在桂花花瓣衰老过程中的功能提供参考依据。结果表明:*DAD-1* 基因由 560 个碱基组成,包含一个 351 bp 的完整开放阅读框和一个 3'-Poly A 尾巴;*DAD-1* 基因编码的蛋白包含 116 个氨基酸,其结构预测表明 *DAD-1* 蛋白属于疏水性膜整合蛋白,通过 3 个  $\alpha$ -螺旋构成的跨膜区行使功能。半定量 PCR 结果表明,该基因在“柳叶金桂”的根、茎、叶、花等各组织器官中均有表达,且在花苞、新叶等幼嫩组织器官中相对表达量较高,在老叶等成熟组织器官中相对表达量较低。实时荧光定量 PCR 结果表明,在“柳叶金桂”花瓣衰老过程中,*DAD-1* 基因在铃梗期开始显著下调表达。

**关键词:**桂花;*DAD-1* 基因;细胞程序性死亡;花瓣衰老

**中图分类号:**S 685.130.36 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)08-0096-07

多萜基二磷酸寡聚糖蛋白葡萄糖基转移酶亚基(dolichyl-diphospho-oligosaccharide-protein glycosyl-transferase subunit, *DAD-1*)是定位于内质网膜上寡糖基转移酶复合体上的一个亚基,参与天门冬氨酸介导的 N-糖基化修饰<sup>[1-2]</sup>。研究表明,*DAD-1* 蛋白的缺失会引发仓鼠温度敏感型 tsBN7 细胞凋亡<sup>[3]</sup>,因此被认为是细胞凋亡的负调控因子。将人、拟南芥和水稻的 *DAD-1* 基因转入仓鼠 *DAD-1* 缺失的突变体细胞中,能够抑制细胞凋亡<sup>[3-5]</sup>,表明动、植物细胞的 *DAD-1* 基因具有相似的生物学功能。在植物细胞中,敲除的小麦的 *DAD-1* 基因,使小麦对条锈病菌更敏感,而在烟草叶片中过量表达小麦的 *DAD-1* 基因则抑制了其细胞凋亡的发生<sup>[6]</sup>。超量表达拟南

芥的 *DAD-1* 基因,使拟南芥对细胞程序性死亡(programmed cell death, PCD)诱导因子  $H_2O_2$  表现出较强的抗性<sup>[7]</sup>,表明 *DAD-1* 基因在植物细胞抗凋亡过程中发挥着重要的作用。

桂花(*Osmanthus fragrans* L.)是我国的十大传统名花之一,自古享有“独占三秋压众芳”的美誉<sup>[8]</sup>。其树姿优美,在园林中广泛用作行道树、孤植树;因香气浓郁,被列为我国重要的天然保健植物和特产经济香花植物,广泛用于食品添加剂及护肤品等产业<sup>[9]</sup>。然而,由于桂花花期较短,最佳观赏期和采收期仅 2 d,极大地限制了其观赏价值与经济价值。课题组前期研究发现,在桂花花瓣衰老过程中观察到典型的 PCD 现象,如蛋白酶活性变化、核 DNA 断裂、细胞核浓缩及染色质凝集等<sup>[10-12]</sup>,然而该过程的发生机制尚不清楚。作为 PCD 的负调控因子,*DAD-1* 基因在桂花衰老过程中的表达模式及功能也有待进一步研究。

该研究以“柳叶金桂”(O. *fragrans* ‘Liuye Jingui’)为试材,克隆得到 *DAD-1* 基因全长序列,分析其在桂花不同组织部位及开花阶段的时空表达模式,以期为进一步研究该基因在桂花花瓣衰老及细胞程序性死亡过程中的功能奠定基础。

**第一作者简介:**邹晶晶(1985-),女,博士,讲师,研究方向为观赏植物采后生理与分子生物学。E-mail: xingxingzou@163.com.

**责任作者:**王彩云(1963-),女,博士,教授,研究方向为观赏植物栽培及采后生理。E-mail: 248361509@qq.com.

**基金项目:**湖北省教育厅科学技术研究资助项目(Q20162805);湖北科技学院博士启动基金资助项目(BK1429)。

**收稿日期:**2016-12-13

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试桂花组织采自华中农业大学校园内 40~50 年的健康植株,四周光照均匀、无病虫害的“柳叶金桂”(O. fragrans ‘Liuye Jingui’)。根据桂花花瓣开放及衰老特点,参考 ZOU 等<sup>[12]</sup>关于其开花级数的划分体系,将萎蔫脱落型桂花品种“柳叶金桂”衰老进程划分为 5 个时期,即 1~5 级数。

供试剂:常用的药品及试剂购自上海国药集团化学试剂有限公司,分析纯;RNA 提取试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司;DNA 消化酶、反转录酶均购自美国 Promega 公司;常规 PCR 所用 DL 2 000 DNA Marker, 2×Taq Master Mix 均购自北京康为世纪生物科技有限公司;琼脂糖、酵母提取物、蛋白胨均购自 Sigma 公司,进口分析纯;连接载体及转化所用感受态细胞试剂盒、Real-time PCR Master Mix 均购自北京全式金生物技术有限公司;DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。

### 1.2 试验方法

1.2.1 RNA 的提取及第一链 cDNA 的合成 参考陆铃<sup>[13]</sup>的方法,用改良 Trizol 法提取桂花盛花期花瓣总 RNA。在 RNA 沉淀过程中加入 1/2 体积异丙醇后,再加入 1/2 体积(上清)的 RNA 沉淀试剂(1.2 mol·L<sup>-1</sup> NaCl, 0.8 mol·L<sup>-1</sup> 柠檬酸钠);然后加入 RNase-free DNase 去除总 RNA 中残留的 DNA,再用反转录酶 M-MLV 合成第一链 cDNA。取 20 μL cDNA 用去 RNA 及 DNA 的水稀释 10 倍后,放在-20℃冰箱保存备用。

1.2.2 看家基因  $\beta$ actin 及 DAD-1 基因序列片段克隆 根据 NCBI 数据库中木犀属油橄榄(Olea europaea L.) $\beta$ actin 基因序列(登陆号 AF545569)设计引物 A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>(表 1)。PCR 反应扩增体系:1 μL 特异引物(A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>), 1 μL cDNA 模板, 10 μL 2×Taq Master Mix, 加无菌水至 20 μL 终体系后,瞬时离心。PCR 扩增的程序:94℃ 4 min; 94℃ 30 s, 51.4℃ 30 s, 72℃ 40 s, 35 个循环; 72℃ 8 min; 12℃ 保存。将 NCBI 数据库中拟南芥(Arabidopsis, NM\_102954)、柑橘(Citrus, AB011798)、烟草(Nicotiana, AB058921)、杨树(Populus, AF086839)、苹果(Malus, U68560)等物种的 DAD-1 同源基因的核苷酸序列与 cDNA 编码的氨基酸序列用 Clustal W 进行同源性比对,找出高度保守的区段,根据同源性高和简并性低的原则,利用 Primer 5 软件,手工

设计巢式 PCR 的 2 对简并引物 A<sub>3</sub>~A<sub>6</sub>(表 1),扩增桂花花瓣 DAD-1 基因片段。PCR 反应体系同上。PCR 反应程序如下。第 1 轮 PCR 扩增: 94℃ 4 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 40 s, 35 个循环; 72℃ 10 min; 12℃ 保存。第 2 轮 PCR 扩增: 94℃ 4 min; 94℃ 30 s, 5℃ 30 s, 72℃ 40 s, 35 个循环; 72℃ 10 min; 12℃ 保存。

1.2.3 桂花 DAD-1 基因的全长克隆 采用 Primer Primer 5 结合 MEGA 5.0 软件,根据该 DAD-1 序列片段的保守区域设计向该序列片段两翼扩增的 3 对嵌套引物(表 1),正向引物为 B<sub>1</sub>~B<sub>3</sub>,反向引物为 B<sub>4</sub>~B<sub>6</sub>。采用交错式热不对称 PCR 法(TAIL-PCR)扩增的随机引物 B<sub>7</sub>~B<sub>11</sub>。TAIL-PCR 反应体系如下: 1) 取 0.6 μL 特异引物 FSP<sub>1</sub> 和 RSP<sub>1</sub>, 2 μL 随机引物(AD<sub>1</sub>~AD<sub>4</sub>), 2 μL 反转录的 cDNA 模板, 10 μL 2×Taq Master Mix, 加入 5.4 μL 无菌水至 20 μL 终体系,进行第 1 轮 PCR 扩增。扩增程序: 93℃ 2 min; 95℃ 1 min; 94℃ 30 s, 60℃ 1 min, 72℃ 3 min, 10 个循环; 94℃ 30 s; 25℃ 2 min; 以 5℃·s<sup>-1</sup> 的速度逐步升温至 72℃; 72℃ 3 min; 94℃ 20 s, 58℃ 1 min, 72℃ 3 min, 25 个循环; 72℃ 5 min。2) 0.6 μL 特异引物 FSP<sub>2</sub> 和 RSP<sub>2</sub>, 0.6 μL 随机引物 AC, 1 μL 第 1 轮 PCR 产物稀释 40~100 倍, 12.5 μL 2×Taq Master Mix, 10.3 μL 无菌水至 25 μL 终体系,进行第 2 轮 PCR 扩增。扩增程序: 94℃ 20 s, 65℃ 1 min, 72℃ 3 min, 1 个循环; 94℃ 20 s, 68℃ 1 min, 72℃ 3 min, 94℃ 20 s, 68℃ 1 min, 72℃ 3 min, 94℃ 20 s, 50℃ 1 min, 72℃ 3 min, 13 个循环; 72℃ 5 min。3) 取特异引物 FSP<sub>3</sub> 和 RSP<sub>3</sub>, 1 μL 第 2 轮 PCR 产物稀释 20~100 倍为模板,进行第 3 轮 PCR 扩增。程序如下: 94℃ 20 s, 68℃ 1 min, 72℃ 3 min, 94℃ 20 s, 68℃ 1 min, 72℃ 3 min, 94℃ 20 s, 50℃ 1 min, 72℃ 3 min, 6~7 个循环; 72℃ 5 min。

1.2.4 DAD-1 基因扩增产物的回收、连接测序及比对分析 取 2 μL DAD-1 基因的 PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,琼脂糖凝胶的浓度为 2%。DNA 片段按照回收试剂盒说明进行。按感受态细胞说明书操作步骤,将 PCR 回收产物连接载体后,挑取含目的片段序列的菌落送武汉美吉生物科技有限公司测序。测序返回的核酸序列与 NCBI 的 GenBank、BLAST 等数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行比对,拼接后与其它序列进行同源性分析。基因结构预测用 Gene Finding 软件(<http://linux1.softberry.com/cgi-bin/programs/gfind/>)

fgenes.h.pl)进行,蛋白质结构分析用 Exspasy 软件 (<http://www.expasy.org/tools/>)进行。

1.2.5 *DAD-1* 基因在桂花不同组织部位及时期的表达分析 提取 0.2 g“柳叶金桂”根、茎、老叶、新叶以及不同衰老阶段花瓣等各组织器官的总 RNA 合成第一链 cDNA,稀释 10 倍备用。用实时荧光定量 PCR 仪对“柳叶金桂”花瓣不同衰老阶段的 *DAD-1* 基因表达情况进行相对实时荧光定量分析。Real-

time PCR 反应体系:4  $\mu$ L cDNA 模板,10  $\mu$ L SYBR Green/Flourescein qPCR Master Mix (2 $\times$ ),5.2  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 和 0.4  $\mu$ L 正向和反向特异引物(C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub>)。以桂花保守的看家基因  $\beta$ -actin 作为 *DAD-1* 基因 Real-time PCR 分析的内参基因,引物序列为 C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>。实时荧光定量 PCR 扩增程序:50  $^{\circ}$ C 2 min;95  $^{\circ}$ C 10 min;95  $^{\circ}$ C 30 s,60  $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环。

表 1  $\beta$ -actin 和 *DAD-1* 基因克隆所用引物

Table 1 Primers for cloning of $\beta$ -actin and <i>DAD-1</i> gene		
No.	引物编号 Primer No.	引物序列 Primer sequence
A <sub>1</sub>	<i>Ol</i> Actin 正向 F <sub>1</sub>	5'-AGTCCTCTTCCAGCCTTCTTT-3'
A <sub>2</sub>	<i>Ol</i> Actin 反向 R <sub>1</sub>	5'-ATTTCCTTGCTCATACGGTCA-3'
A <sub>3</sub>	<i>Os</i> DAD 正向 F <sub>1</sub>	5'-ACTCCBACHAVYCTYAAGAT-3'
A <sub>4</sub>	<i>Os</i> DAD 反向 R <sub>1</sub>	5'-CCDAGGAARTTSATRATCAACA-3'
A <sub>5</sub>	<i>Os</i> DAD 正向 F <sub>2</sub>	5'-GTBGGRTCMTTYCCATTYAATC-3'
A <sub>6</sub>	<i>Os</i> DAD 正向 R <sub>2</sub>	5'-AGVACYAARTTGCAGAGAACAAA-3'
B <sub>1</sub>	TAIL-PCR FSP <sub>1</sub>	5'-TTTAACTCCTTTCTTTCTGGGGTAC-3'
B <sub>2</sub>	TAIL-PCR FSP <sub>2</sub>	5'-GGGTACCTTCGTGTGTAGGGACTGC-3'
B <sub>3</sub>	TAIL-PCR FSP <sub>3</sub>	5'-TCAAGGATTACCTCCAGAACGTGC-3'
B <sub>4</sub>	TAIL-PCR RSP <sub>1</sub>	5'-CAGAGAACAAAATCTGCAAATGCAC-3'
B <sub>5</sub>	TAIL-PCR RSP <sub>2</sub>	5'-GCACGTTCTGGAGGTAAATCCTTGA-3'
B <sub>6</sub>	TAIL-PCR RSP <sub>3</sub>	5'-TCCCTACACAGAAGGTACCCACAGA-3'
B <sub>7</sub>	AD <sub>1</sub>	5'-ACGATGGACTCCAGAG (G/C/A)N(G/C/A)NNNGGAA-3'
B <sub>8</sub>	AD <sub>2</sub>	5'-ACGATGGACTCCAGAG (G/C/T)N(G/C/T)NNNGGTT-3'
B <sub>9</sub>	AD <sub>3</sub>	5'-ACGATGGACTCCAGAG (G/C/A)(G/C/A)N(G/C/A)NNNCCAA-3'
B <sub>10</sub>	AD <sub>4</sub>	5'-ACGATGGACTCCAGAG (G/C/T)(G/A/T)N(G/C/T)NNNGGTT-3'
B <sub>11</sub>	AC	5'-ACGATGGACTCCAGAG-3'
C <sub>1</sub>	Real time PCR <i>Os</i> Actin 正	5'-CCAGCCTTCTTTGATAGGAATGG-3'
C <sub>2</sub>	Real time PCR <i>Os</i> Actin 反	5'-CAACATCGCACTTCATGATTGA-3'
C <sub>3</sub>	Real time PCR <i>Os</i> DAD1 正	5'-TTTAACTCCTTTCTTTCTGGGGTAC-3'
C <sub>4</sub>	Real time PCR <i>Os</i> DAD1 反	5'-GCACGTTCTGGAGGTAAATCCTTGA-3'

### 1.3 数据分析

每个处理进行 3 次生物学重复。试验数据为平均数 $\pm$ 标准误,采用 SAS 8.0 软件进行方差分析和多重比较分析(Duncan,  $P=0.05$ )。

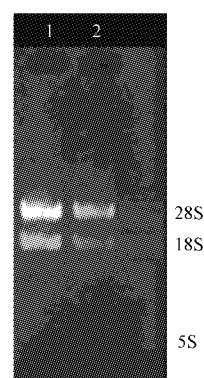
## 2 结果与分析

### 2.1 花瓣总 RNA 的提取

由图 1 可知,Trizol 法可以完全去除蛋白质和 DNA 残留,特异性的沉淀 RNA,得到的 RNA 不仅浓度较高,28S:18S 带亮度比接近 2:1,且该法操作简单易行、效率较高,质量完全满足进一步基因克隆要求。

### 2.2 看家基因 $\beta$ -actin 及 *DAD-1* 基因序列片段克隆

由图 2 可知,PCR 产物在 100~200 bp 有一条亮带,且上下无杂带,推测是  $\beta$ -actin 基因片段。由图 3 可知,第 1 轮 PCR 无明显亮带;第 2 轮 PCR 扩增产物在 100~250 bp 有一条亮带,与预测的基因片段大小基本相符,判断为目的基因片段。



注:1~2 为样品。

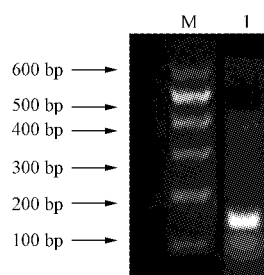
Note:1-2. Samples.

图 1 改良的 Trizol 法提取桂花花瓣总 RNA

Fig.1 Gel-electrophoretic analysis of total RNA isolated by improved Trizol method from petals in *O. fragrans*

### 2.3 *DAD-1* 基因全长克隆

由图 4 可知,在 450 bp 附近有单一条带(第 1 泳

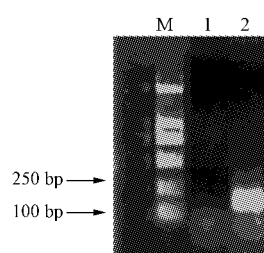


注: M, DNA Marker; 1, 样品。

Note: M, DNA Marker; 1, Sample.

图2  $\beta$ -actin RT-PCR 扩增

Fig. 2 Amplification of  $\beta$ -actin by RT-PCR

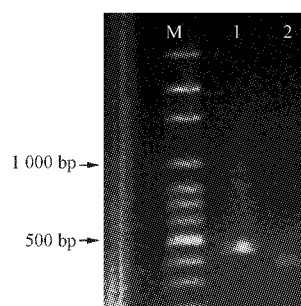


注: M, DNA Marker; 1, 第 1 轮 PCR 产物; 2, 第 2 轮 PCR 产物。

Note: M, DNA Marker; 1, Production of the first step of nested PCR; 2, Production of the second step of nested PCR.

图3  $DAD-1$  基因巢式 RT-PCR

Fig. 3 Nested RT-PCR for  $DAD-1$  gene



注: M, DNA Marker; 1, 3' 产物; 2, 5' 产物。

Note: M, DNA Marker; 1, 3' end product; 2, 5' end product.

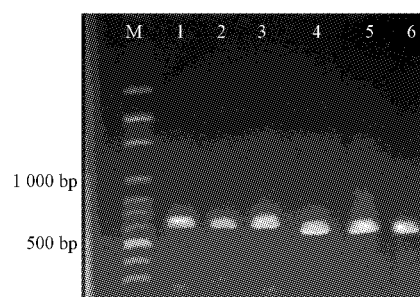
图4  $DAD-1$  基因 TAIL-PCR 扩增

Fig. 4 Amplification of  $DAD-1$  gene by TAIL-PCR

道);特异引物 RSP<sub>3</sub> 与随机引物 AC 结合时,在 400 bp 产生明显单一主带(图 4 第 2 泳道),推测该 2 条带为目的基因条带。

#### 2.4 PCR 产物的回收

将上述 2 条单一主带进行切胶回收。将 PCR 回收产物连接 Trans pEASY-T1 载体,并转化到感受态细胞中培养过夜。以阳性克隆菌液为模板,以 M13 F 和 M13 R 为引物进行菌落 PCR 检测,由图 5 可知,正向和反向产物结果表明,目的片段连接成



注: M, DNA Marker; 1~3, 3' 产物; 4~6, 5' 产物。

Note: M, DNA Marker; 1~3, 3' end product; 4~6, 5' end product.

图5  $DAD-1$  基因菌落 PCR 检测

Fig. 5 Colony PCR analysis of  $DAD-1$  gene

功。随机各挑取 10 个阳性克隆送交武汉美吉科技有限公司进行测序。

#### 2.5 $DAD-1$ 基因结构预测

由图 6 可知, $DAD-1$  基因序列共由 560 个碱基组成。将该序列用 Gene Finding 软件进行基因结构预测,由图 7 可知,该序列片断包含 1 个完整的开放阅读框(open reading frame, ORF),包括第 1~366 碱基的序列。此外,该序列在第 537 碱基处有 1 个 3'-Poly A 的尾巴结构。

#### 2.6 $DAD-1$ 基因编码的蛋白质结构分析

由图 8 可知, $DAD-1$  蛋白由 116 个氨基酸组成,预测的蛋白质相对分子式为  $C_{584}H_{928}N_{146}O_{155}S_7$ ,共由 1 820 个原子组成,分子量为 12 699.1。预测结果还表明,该蛋白质的等电点 pI 为 8.91,脂溶指数为 115.09,总平均亲水性为 0.704,属于疏水性蛋白。蛋白质的二级结构分析表明,该蛋白质以  $\alpha$ -螺旋(alpha helix)结构为主,其比例约占 70.69%,此外无规则卷曲(random coil)的比例占 23.28%, $\beta$ -转角(beta turn)的比例为 2.59%(图 9)。该蛋白的三级结构分析表明, $DAD-1$  蛋白属于膜整合蛋白,是细胞膜不可或缺的结构成分之一,其跨膜区由 3 个跨膜的  $\alpha$ -螺旋形成亲水通道。3 个跨膜区的 N-末端分别为 32、59、94,C-末端分别为 54、80、116,长度为 22~23 个氨基酸(图 10)。

#### 2.7 桂花 $DAD-1$ 基因不同组织部位的表达分析

为了进一步确定  $DAD-1$  基因在桂花中的表达模式,分别提取“柳叶金桂”根、茎、叶、花中的 RNA,对桂花不同组织部位中的  $DAD-1$  基因进行半定量分析。由图 11 可知,其中用于半定量分析的  $\beta$ -actin 片段在 77 bp 左右, $DAD-1$  基因序列片段长度在 119 bp 左右。结果表明,内参基因  $\beta$ -actin 在桂花的不同组织器官里均有表达,而且表达稳定一致;

```

1  aaaaaaaglg a aaaaaaalg g gaaatcagcg acatcgaagg alggcccaagc aclllllcat
61 tctcttcgct ctgcatacgt tgcaaccccc actaatctca agatcatcga ttgtatatt
121 atgllllcag lllcclacgc lgtlaallcg g laggllllaca lggclallgl lggallcaltc
181 ccccttfaact cctttctttc tgggggtacct tctgtgtgtag ggactgcagt tcttgcgtgtt
241 lgllclacgla lacaaglgaa caaagaaaac aaggaaallca aggaallacc lccagaacgl
301 gcatttgcag attttgtttc ctgcaattta gtgcttcatt tggtaatcat gaacttcctc
361 ggclaaagllg glcccclllg aaacgaataa tcagllllcaa glilllgataa llaggcgaga
421 cacagattga catttacaag aagacttgaa atcatctgtt tatgagccaa tcatcaactg
481 lgllaaclgl alllgcllll gllglllaaa gacatgccll aaatctlgga claaacaaaa
541 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

```

图 6 DAD-1 基因序列

Fig. 6 Sequence of DAD-1 gene in *O. fragrans*

FGENESH 2.6 Prediction of potential genes in Dicot\_ar ab genomic DNA

Seqname: test sequence

Length of sequence: 560

Number of predicted genes 1: in + chain 1, in -chain 0.

Number of predicted exons 1: in + chain 1, in -chain 0.

Positions of predicted genes and exons: Variant 1 from 1, Score: 16.857477

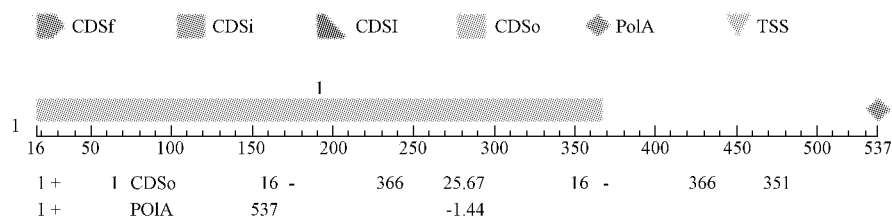


图 7 DAD-1 基因结构预测

Fig. 7 Structure prediction of DAD-1 gene

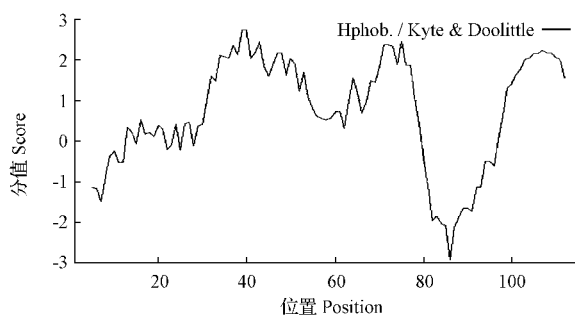


图 8 DAD-1 蛋白亲水性与疏水性分析

Fig. 8 Analysis of hydrophilicity and hydrophobicity of DAD-1 protein

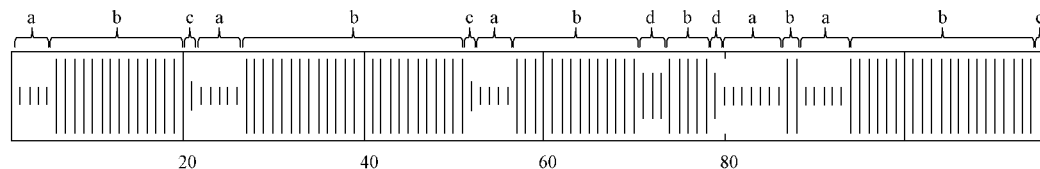
注: a, 不规则卷曲; b, 螺旋; c,  $\beta$  转角; d,  $\beta$  折叠。Note: a, helix; b, coil; c,  $\beta$  turn; d,  $\beta$  sheet.

图 9 DAD-1 蛋白二级结构分析

Fig. 9 Secondary structure of DAD-1 protein

而 DAD-1 基因在桂花的根、茎、叶、花等各组织器官中也均有表达,且在桂花幼嫩的叶片和花中表达量相对较高,而在桂花成熟的叶片中表达量则相对较低。

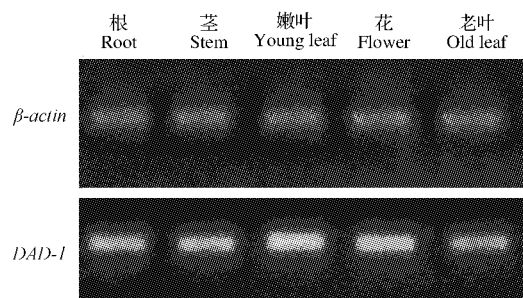
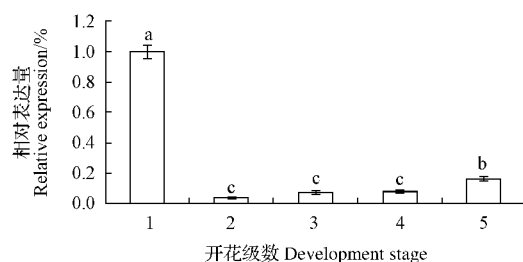
## 2.8 桂花花瓣 DAD-1 基因不同衰老阶段的表达分析

以自然花期 5 个时期的桂花花瓣 cDNA 为模板,进行 Real-time PCR 扩增,以观察各时期 DAD-1



图 10 DAD-1 蛋白三级结构分析

Fig. 10 Tertiary structure for DAD-1 protein

图 11 DAD-1 基因不同组织器官表达差异  
半定量 RT-PCR 分析Fig. 11 Semi-quantitative RT-PCR analysis of  
expression of DAD-1 gene in different tissues and  
organs of *O. fragrans* 'Liuye Jingui'图 12 “柳叶金桂”花瓣衰老过程中 DAD-1 基因  
表达量的变化Fig. 12 Real-time PCR analysis of DAD-1 expression in  
petals of *O. fragrans* 'Liuye Jingui' at each  
developmental stage that attached to the plant

的表达量差异。由图 12 可知, DAD-1 基因的表达量在铃梗期(stage 1)最高,随着小花的开放,表达量急剧下降。后期又有不同程度的升高,但升高幅度小,直到萎蔫末期,其表达值不及铃梗期的 1/6。

### 3 讨论与结论

研究表明,动、植物细胞中的 DAD-1 蛋白具有较高的同源性<sup>[14-17]</sup>。该研究克隆得到的桂花 DAD-1 基因翻译的氨基酸序列分析表明,桂花 DAD-1 蛋白与可可树 (EOY25213.1)、杨树 (XP\_002303440.1, AAD02848.1)、柚子 (XP\_006432730.1)、温州蜜柑 (BAA36556.1) 等多个物种的 DAD-1 蛋白的氨基酸序列相似性达 90% 以上。由此可见,该 DAD-1 蛋白是一个进化史上相对保守的蛋白。对 DAD-1 蛋白

进行结构预测发现,该蛋白质以  $\alpha$ -螺旋结构为主,属于膜整合蛋白,其跨膜区由 3 个跨膜的  $\alpha$ -螺旋形成亲水通道,与小麦 DAD-1 蛋白预测结果相似<sup>[6]</sup>。

DAD-1 基因在植物细胞中的时空表达范围比较广泛,一般来说,在各组织器官及发育的各阶段都有表达。然而,不同物种 DAD-1 基因在不同组织器官和发育阶段的表达模式不尽相同。研究表明, DAD-1 基因在小麦、棉花、烟草等植物的根、茎、叶、花等各组织器官中均有表达,且在棉花的花、种胚等幼嫩的组织中表达量较高,随着棉花的衰老,叶片中的 DAD-1 基因的相对表达量逐渐降低<sup>[14]</sup>;而在烟草中, DAD-1 基因在根与茎中的表达水平显著高于叶与花<sup>[18]</sup>。该研究表明, DAD-1 基因在桂花的根、茎、叶、花等各组织器官中也均有表达,且在幼嫩的组织器官,如嫩叶、花中的相对表达量比成熟的组织器官根、茎、老叶中略高。

作为细胞程序性死亡的抗凋亡因子之一,研究表明, DAD-1 基因的表达丰度在 PCD 诱发之前明显下调<sup>[19]</sup>。在观赏植物的花瓣衰老中, DAD-1 基因丰度在六出花、唐菖蒲等物种中下调较早,如在花瓣刚开放,或远早于花瓣可见衰老特征,花瓣萎蔫前便急剧下调<sup>[20-21]</sup>;而在另一些观赏植物,如鸢尾和香石竹中, DAD-1 基因下调表达则发生较晚,在花瓣可见衰老特征出现时才开始下调<sup>[22]</sup>。该研究表明,在桂花花瓣衰老中, DAD-1 基因在铃梗期(stage 1)表达量最高,在初花期(stage 2)花朵刚刚开放时急速下降,远早于盛花末期(stage 4)可见衰老特征出现,推测桂花花瓣的细胞程序性死亡可能启动较早。该研究为后续进一步验证 DAD-1 基因在桂花花瓣衰老及细胞程序性死亡过程中的功能奠定了一定基础。

### 参考文献

- [1] KELLEHER D J, GILMORE R. DAD1, the defender against apoptotic cell death, is a subunit of the mammalian oligosaccharyltransferase[J]. P Natl Acad Sci USA, 1997, 94(10): 4994-4999.
- [2] ROBOTI P, HIGH S. The oligosaccharyltransferase subunits OST48, DAD1 and KCP2 function as ubiquitous and selective modulators of mammalian N-glycosylation[J]. J Cell Sci, 2012, 125(14): 3474-3484.
- [3] NAKASHIMA T, SEKIGUCHI T, KURAOKA A, et al. Molecu-

lar cloning of a human cDNA encoding novel protein, DAD1, whose defect causes apoptotic cell death in hamster BHK21 cells[J]. Molecular and Cellular Biology, 1993, 13(10): 6367-6374.

[4] GALLOIS P, MAKISHIMA T, HECHT V, et al. An *Arabidopsis thaliana* cDNA complementing a hamster apoptosis suppressor mutant[J]. Plant J, 1997, 11(6): 1325-1331.

[5] TANAKA Y, MAKISHIMA T, SASABE M, et al. DAD-1, a putative programmed cell death suppressor gene in rice[J]. Plant Cell Physiol, 1997, 38(3): 379-383.

[6] WANG X J, TANG C L, ZHANG H C, et al. TaDAD2, a negative regulator of programmed cell death, is important for the interaction between wheat and the stripe rust fungus[J]. Mol Plant Microbe In, 2011, 24(1): 79-90.

[7] 贾志蓉, 李丹, 吕应堂. 拟南芥 *AtDAD1* 超量表达植株对  $H_2O_2$  抗性的研究[J]. 武汉植物学研究, 2004(22): 373-379.

[8] 蔡璇, 苏繁, 金荷仙, 等. 四季桂花瓣色素的初步鉴定与提取方法[J]. 浙江林学院学报, 2010, 27(4): 559-564.

[9] 邹晶晶, 袁斌, 高微, 等. 桂花未成熟合子胚诱导体细胞胚再生[C]//中国观赏园艺研究进展. 2015 年中国观赏园艺学术研讨会, 2015: 238-242.

[10] 阳韶昆, 蔡璇, 邹晶晶, 等. 桂花开放与衰老过程中花瓣蛋白酶活性与种类的变化[J]. 园艺学报, 2012, 39(10): 1967-1974.

[11] 周媛. 桂花花瓣衰老过程中细胞程序性死亡特征与机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.

[12] ZOU J J, ZHOU Y, CAI X, et al. Increase in DNA fragmentation and the role of ethylene and reactive oxygen species in petal senescence of *Osmanthus fragrans*[J]. Postharvest Biol Tec, 2014, 93: 97-105.

[13] 陆铃. 桂花 *DAD-1* 同源基因片段的克隆及表达分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.

[14] 龚文芳. 棉花抗细胞凋亡基因 *GhDAD1* 的克隆、定位及表达分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.

[15] 孙建富, 陈尚珂, 王爱英, 等. 新疆雪莲 *DAD1* 基因提高烟草的抗旱性与抗盐性[J]. 江苏农业科学, 2011(39): 84-86.

[16] 杨舒雅, 史娟, 马斌芳, 等. 抗细胞凋亡因子 *DAD1* 的研究进展[J]. 生理科学进展, 2012(43): 315-318.

[17] 国栋, 和四梅, 张丽莉, 等. 杂色鲍 *DAD1* 的克隆及在发育、弧菌感染、高温和缺氧下的表达分析[J]. 水产学报, 2016, 40(7): 1018-1027.

[18] 潘永娟. 烟草 *ZX4D7* 基因功能初探[D]. 武汉: 华中农业大学, 2014.

[19] LINDHOLM P, KUITTINEN T, SORRI O, et al. Glycosylation of phytase and expression of *dad1*, *dad2* and *ost1* during onset of cell death in germinating barley scutella[J]. Mech Dev, 2000, 93(12): 169-173.

[20] WAGSTAFF C, MALCOLM P, RAFIQ A, et al. Programmed cell death (PCD) processes begin extremely early in *Alstroemeria* petal senescence[J]. New Phytol, 2003, 160(1): 49-59.

[22] YAMADA T, TAKATSU Y, KASUMI M, et al. A homolog of the defender against apoptotic death gene (*DAD1*) in senescing gladiolus petals is down-regulated prior to the onset of programmed cell death[J]. J Plant Physiol, 2004, 161(11): 1281-1283.

[23] van der KOP D A M, RUYS G, DEES D, et al. Expression of defender against apoptotic death (*DAD-1*) in *Iris* and *Dianthus* petals[J]. Physiol Plantarum, 2003, 117(2): 256-263.

## Cloning and Expression Analysis of *DAD-1* Gene in *Osmanthus fragrans*

ZOU Jingjing<sup>1</sup>, LU Ling<sup>2</sup>, ZENG Xiangling<sup>1</sup>, WANG Caiyun<sup>3</sup>

(1. School of Nuclear Technology and Chemistry & Biology, Hubei University of Science and Technology, Xianning, Hubei 437100; 2. Institute of Vegetables, Xiaogan Academy of Agricultural Sciences, Xiaogan, Hubei 432000; 3. Key Laboratory for Biology of Horticultural Plants, Ministry of Education, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070)

**Abstract:** *Osmanthus fragrans* 'Liuye Jingui' was used as tested material. The complete coding sequence (CDS) of *DAD-1* gene was cloned by the method of thermal asymmetric interlaced PCR (TAIL-PCR), and its expression patterns in different organs and different flowering stages in *O. fragrans* were analyzed, to provide reference for studying the function of this gene during the flower senescence. The results showed that the length of *DAD-1* gene was constituted of 560 bases with an open reading frame of 351 bp and a 3'-Poly A. The *DAD-1* protein encoded 116 amino acids, and it was a hydrophobic integration membrane protein with three alpha-helices in the structure. The results of semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) showed that *DAD-1* expressed in most tissues of sweet *Osmanthus*, such as the stem, root, flower and leaf, and it was higher in the young organs such as young flowers and new leaves, but lower in old organs such as the old leaves. The results of quantitative real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) showed that *DAD-1* abundance rapidly decreased at the initial flowering stage, much earlier than the visible senescence symptoms.

**Keywords:** *Osmanthus fragrans*; *DAD-1* gene; program cell death; flower senescence