

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

花生簇葉病病原菌質體 *gyrB* 和 *gyrA* 基因之選殖與分析(1/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2313-B-002-336-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：國立臺灣大學植物病理學系暨研究所

計畫主持人：林長平

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 5 月 29 日

摘要

花生簇葉病 (Peanut witches' broom, PNWB) 是由植物菌質體 (phytoplasma) 所引起之病害。Gyrase 是由 *gyrA* 及 *gyrB* 基因分別轉譯出的兩個 A subunits 及兩個 B subunits 所共同組成。本研究為進行花生簇葉病病原菌質體 *gyrB* 及 *gyrA* 基因選殖。以 *Acholeplasma laidlawii* 及 *Mycoplasma* spp. 等細菌之 *gyrB* 基因進行比對，根據其高保守性區域設計 PCR 引子。以罹病日日春植株全 DNA 及健康植株全 DNA 為模板分別進行 PCR 反應，結果以罹病植株全 DNA 為模板時可獲得一 1.4 kb 大小之 PCR 產物，此片段為以健康植株全 DNA 為模板，進行 PCR 反應時無法增幅出。將此 1.4 kb 大小之 PCR 產物進行核甘酸序列之分析及比對，發現此序列與 NCBI 資料庫中 *gyrB* 基因之核甘酸序列具相似性，並以此序列設計 PCR 引子對以增幅出篩選用核酸探針，並以此探針對花生簇葉病病原菌質體之基因庫進行篩選之工作，以利選殖出具有嵌入片段包含完整 *gyrB* 之 ORF 之重組質體。由其他細菌上的研究中指出，在革蘭氏陽性菌上 *gyrB* 及 *gyrA* 基因常以 coupled (*gyrB-gyrA*) 的方式存在 (Ladefoged *et al.* 1994, Oppegaard *et al.* 1996)。為了進一步選殖出完整的 *gyrA* 基因，擬利用已部分解序完成的 *gyrB* 基因序列設計一股正股引子，並至 GCG 基因庫中收集包括 *Bacillus* sp.、*Mycoplasma genitalium* 及 *E. coli* 等細菌之 *gyrA* 基因核酸序列與胺基酸序列，進行 *gyrA* 基因序列比對及反股引子 (reverse primer) 的設計，以進行 *gyrA* 基因選殖之工作。

關鍵詞：*gyrB* 基因、*gyrA* 基因、花生簇葉病、植物菌質體

Abstract

DNA gyrase is a type II topoisomerase that is a tetrameric molecule composed of two A and two B subunits, which are encoded by the *gyrA* and *gyrB* genes, respectively. In order to clone and analyse the *gyrB* gene, a pair of oligo-nucleotides PCR primer GBF2/ GBR3 was designed according to the sequences of the *gyrB* gene of *Acholeplasma laidlawii*, *Escherichia coli*, *Bacillus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptomyces spheroides*, *Spiroplasma citri* and *Mycoplasma* spp. Total DNA from diseased periwinkle infected with phytoplasma associated with peanut witches' broom (PNWB) was prepared for PCR reaction to amplify a 1458 bp-PCR fragment of the *gyrB* gene of the phytoplasma. A 768 bp-PCR product was then amplified by using the primers GBF3, GBR5 synthesized according to the sequences of the 1458 bp-PCR fragment and used as a nucleic acid probe for the screening of the Lambda ZAP II genomic library of PNWB-phytoplasma.

Keywords: *gyrB* gene 、 *gyrA* gene 、 peanut witches' broom 、 phytoplasma

前言

植物菌質體 (phytoplasma)，原名似菌質體 (mycoplasmas-like organism, MLO)，是一種重要的植物病原細菌，可造成罹病植株出現枝條增生、花器葉化、萎凋、黃化及簇葉等病徵。目前已知全球有超過兩百種的植物病害是由 phytoplasma 所引起 (Agrios, 1997)。此病原菌最早是在 1967 年被發現，但由於迄今仍無法以人工方式對此病原菌作純培養，故吾人對其生理生化及生物特性的瞭解仍屬有限 (Lim *et al.*, 1992; Sinha, 1979; Sinha, 1980)。花生簇葉病 (peanut witches' broom, PNWB) 在台灣首先於澎湖及苗栗兩地被發現。其病原經鑑定後，確定是由植物病原菌質體所引起之病害 (Yang 1988)。PNWB 花生簇葉病屬豆類簇葉病 (legume witches' broom) 之一，長期以來，台灣地區的花生栽培常受到此病害之危害，對本省花生產業的發展影響很大。

研究目的

DNA 分子在進行複製、轉錄、修補時，DNA 分子間的負超螺旋結構將需要被釋放開來。而負責釋放 DNA 負超螺旋結構或在事後重新再讓雙股 DNA 分子形成負超螺旋結構的酵素，一般通稱為拓撲酵素 (topoisomerase)。DNA gyrase 在一般細菌上是 DNA topoisomerase II 的簡稱 (Gellert *et al.*, 1976)，正常有功能的 gyrase 蛋白是由 *gyrA* 及 *gyrB* 基因分別轉譯出的兩個 A subunits (GyrA) 及兩個 B subunits (GyrB) 所共同組成的四極體 (tetramer) 蛋白 (A_2B_2) (Klevan *et al.*, 1980)。在 gyrase 蛋白上 GyrA subunit 負責切斷及重新連結 DNA 分子，GyrB subunit 則具有 ATP 水解酵素活性 (Mizuuchi *et al.*, 1978, Maxwell *et al.*, 1984)。由於 DNA 分子在進行複製、修復或轉錄時都牽涉到負超螺旋結構的存在與否，所以 gyrase 蛋白在生物體上也就扮演了一個極重要的角色。本研究即從事於花生簇葉病病原菌質體之 *gyrB* 基因及 *gyrA* 基因的選殖，並比較其與其他細菌之 *gyrB* 與 *gyrA* 基因的核酸與胺基酸序列間的差異，以期能對植物菌質體 DNA gyrase 酵素方面的研究有更深一層的認識與瞭解。

文獻探討

雙股螺旋的 DNA 分子結構使得 DNA 可將遺傳訊息正確性傳遞至子代。在一般狀態下，細胞內兩股互補且反向的 DNA 分子是呈一種緊密的負超螺旋結構 (negative supercoil)。DNA 分子在進行複製、轉錄、修補時，都需將雙股 DNA 分子分開來，此時 DNA 分子間的負超螺旋結構將需要被釋放開來。而負責釋放 DNA 負超螺旋結構或在事後重新再讓雙股 DNA 分子形成負超螺旋結構的酵素，一般通稱為拓撲酵素 (topoisomerase)。在細菌上的拓撲酵素可分兩大類 (type)：Type I 包含 DNA topoisomerase I 及 DNA topoisomerase III。這一類的拓撲酵素所具有的特點是每作用一次，改變 DNA 分子在拓撲學上的一個 linking number，亦即是說，每次都是針對單股 DNA 分子行作用。而 Type II 的 DNA 拓撲酵素則包含了 topoisomerase II 及 topoisomerase IV。Type II 與 Type I DNA 拓撲酵素最大不同在於

Type II的DNA 拓撲酵素每次作用時，是改變DNA分子在拓撲學上的二個linking number，亦即是說，每次都是針對雙股DNA分子行作用 (Reece *et al.*, 1991)。DNA gyrase 在一般細菌上是DNA topoisomerase II的簡稱，最初是在1976年時由Gellert等學者在研究大腸桿菌 (*E. coli*) 上與Lambda噬菌體site-specific integration 有關因子時，意外發現了一種可催化並將負超螺旋結構之DNA分子還原為雙股環狀DNA分子的酵素，當時他們稱之為gyrase(Gellert *et al.*, 1976)。gyrase蛋白除了可在不需ATP下催化負超螺旋DNA還原成雙股環狀DNA外，另一方面也可在ATP存在下催化雙股環狀DNA成為負超螺旋的狀態。在細菌上，正常有功能的gyrase蛋白是由 *gyrA* 及 *gyrB* 基因分別轉譯出的兩個A subunits (GyrA) 及兩個B subunits (GyrB) 所共同組成的四極體 (tetramer) 蛋白 (A_2B_2) (Klevan *et al.*, 1980)。在gyrase蛋白上GyrA subunit負責切斷及重新連結DNA分子，GyrB subunit則具有ATP水解酵素活性 (Mizuuchi *et al.*, 1978)。以*E. coli*為例 GyrA蛋白能被分為兩部分：蛋白質的C端約300個胺基酸具有與DNA分子結合的功能，而蛋白質N端則是負責切斷及重新連結DNA分子；GyrB蛋白則在GyrA蛋白及DNA存在下具有很強的ATP水解酵素活性，能水解ATP以提供催化DNA分子形成負超螺旋所需的能量 (Maxwell *et al.*, 1984)。在GyrB蛋白結構上，革蘭氏陽性菌與陰性菌存在著一項明顯的差異，在*Bacillus subtilis*, *Borrelia burgdorferi*, *Haloferax* sp., *Mycoplasma pneumoniae*及*Staphylococcus aureus*等革蘭氏陽性菌的GyrB蛋白上缺乏一段普遍存在於*E. coli*, *Pseudomonas putida*等革蘭氏陰性菌，大小約150個胺基酸之序列 (Huang, 1994)。而在基因的分佈上，革蘭氏陽性菌與陰性菌也同樣存在著差異，在革蘭氏陰性菌如*E. coli*、*Pseudomonas putida*上*gyrB*及*gyrA*二基因相隔數幾千個鹼基 (Ladefoged *et al.*, 1994)，但在革蘭氏陽性菌上二者卻常常是相鄰的，例如在*Bacillus subtilis*上*gyrB*及*gyrA*基因間僅相距214個鹼基。而在*Staphylococcus aureus*之*gyrB*及*gyrA*基因間也僅間隔39個鹼基，甚至在*Mycoplasma pneumoniae*上*gyrB*及*gyrA*還有1個鹼基的重疊 (Huang, 1994)。在*gyrA*及*gyrB*基因進行轉錄作用時，革蘭氏陽性菌與陰性菌也有著差異，在革蘭氏陰性菌上*gyrB*及*gyrA*基因是分開進行轉錄，而在革蘭氏陽性菌中*Mycoplasma gallisepticum*(Forsyth *et al.*, 1995)及*Haloferax volcanii* (Holmes *et al.*, 1991) 上，*gyrB*與*gyrA*能以cotranscription的方式轉錄出*gyrB-gyrA* polycistronic mRNA形式之transcript。但在同屬於革蘭氏陽性菌的*Staphylococcus aureus*上*gyrA*基因卻又能自行轉錄，並不需與*gyrB*基因進行共同轉錄。

而在 gyrase 蛋白的表現方面，Menzel 等人 (1983) 於 *E. coli* 上的研究指出：藉由抑制 DNA gyrase 的活性，會導致細胞內 DNA 分子形成負超螺旋的程度降低，並且可觀測到 GyrA 及 GyrB 蛋白的合成量增加了近十倍之多，推知 gyrase 蛋白的合成可能是由 gyrase 本身自行調控，而且與細胞內 DNA 分子形成負超螺旋的程度有關。由於 DNA 分子在進行複製、修復或轉錄時都牽涉到負超螺旋結構的存在與否，所以 gyrase 蛋白在生物體上也就扮演了一個極重要的角色。

材料與方法

試驗植物來源及繁殖與植物全 DNA (total DNA) 之純化

本實驗以日日春 (periwinkle, *Catharanthus roseus*) 作為試驗植物來繁殖植物菌質體。利用菟絲子 (dodder, *Cuscuta australis*) 作為媒介，將花生病株上之病原植物菌質體由花生傳入日日春健株上 (Yang, 1988)。溫室中乃利用旁嫁接法 (side graft) 繁殖。而植物全DNA抽取之方法主要乃參考Ko等人的方法 (1994)，稍作修改後進行。

花生簇葉病病原菌質體 *gyrB* 基因篩選用核酸探針之製備

本研究選殖花生簇葉病病原菌質體 *gyrB* 2 策略乃欲利用對花生簇葉病病原菌質體具專一性的核酸探針對花生簇葉病病原菌質體基因庫進行篩選，故實驗初期需先製備出此一核酸探針。核酸探針製備的方法如下：首先自基因庫 (Gene Bank) 中收集其他細菌的 *gyrase* 基因序列進行比對 (alignment)，嘗試找出本基因序列之保守性較高的區域 (conserved region)，並根據這些區域設計出聚合酵素連鎖反應之引子 (primers)，以期能利用聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 由罹病日日春全DNA中將花生簇葉病病原菌質體之部分 *gyrase* 基因片段增幅 (amplify) 出來，之後再以 pCRII[®]-TOPO 質體為載體進行此 PCR 產物之選殖，以進行選殖株嵌入片段 (即前述 PCR 產物) 之定序及特性分析，經序列分析及比對確定此 PCR 產物為花生簇葉病病原菌質體 *gyrase* 基因之部分片段後，即可大幅增殖選殖株並將其嵌入 DNA (insert DNA) 純化出來並標識以作為後續實驗中之核酸探針。流程中各實驗細節分段敘述如下：

(一) 聚合酵素連鎖反應 (PCR) 引子 (primer) 之設計與聚合酵素連鎖反應

首先，由國家衛生研究院巨分子序列分析軟體 (GCG, <http://gcg.nhri.org.tw/>) 基因資料庫 (gene bank) 及 NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 基因資料庫中收集細菌 (eubacteria) 之 *gyrase* 基因之核酸序列 (DNA sequence) 與胺基酸序列 (amino acid sequence)。由於植物菌質體在演化親緣上應屬於革蘭式陽性菌 (Gram-positive bacteria)，且應歸屬於 Mollicutes 綱，所以本研究之資料收集乃以親緣關係較近之 Mollicutes 綱及其他革蘭式陽性細菌為主；另輔以已被研究透徹之革蘭式陰性細菌，如 *Escherichia coli* 的資料。由於構成 *gyrase* 蛋白的兩個基因 *gyrB* 及 *gyrA* 在基因庫中以 *gyrB* 基因的資料較為豐富，故先期的選殖對象是以 *gyrB* 基因為主。於基因庫中所蒐集到之資料包括 *Acholeplasma laidlawii*、*Bacillus* sp.、*Mycoplasma arthritidis* 及 *Escherichia coli* 等細菌之 DNA *gyrase* 酵素 B 亞單位 (DNA *gyrase* B subunit) 之胺基酸序列共十三筆。將收集到之核酸及胺基酸序列先行輸入 CLUSTAL (Higgins and Sharp, 1988) 軟體進行比對，並參照前人所比對之結果，找出此蛋白質所特有保守性較高且相距有數百鹼基 (base) 的六個區域，據此設計出長約 20 bp 大小之寡核苷酸 (oligonucleotides) 引子，並委託 Perkin Elmer 公司 (Perkin Elmer Corporation, Norwalk, CT) 進行合成。將合成好的引子用適量的無菌水溶解，使其濃度成為 100 μM，以供聚合酵素連鎖反應所需。PCR 反應中兩引子各 0.5 μM、50 ng 前述罹

病或健康植物全DNA進行進行35個循環，反應溫度如下:94 °C 30秒，50 °C 30秒，72 °C 3分鐘，即完成反應。反應完成後，於1 %瓊脂凝膠 (1x TAE緩衝液)，以4 V/cm之電壓進行電泳分析，經EtBr染色後，觀察聚合酵素連鎖反應的結果。

(二) 聚合酵素連鎖反應產物之選殖 (cloning)

為了對上述PCR產物進行序列分析及比對以確定其是否為花生簇葉病病原菌質體之*gyrB*基因的部份片段，故進一步將其選殖 (clone) 至適當之質體載體，而在選殖之前必須對PCR產物進行純化，以除去不必要的干擾。本實驗所採用 QIAquick PCR purification kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) 及 TOPO TA Cloning[®] Kit (Invitrogen Corporation, San Diego, CA) 進行PCR產物純化及選殖。純化及選殖步驟依據廠商之建議進行。

準轉型株之特性分析

為了確定以 TOPO TA Cloning[®] Kit 所獲 3 轉型株是否確為攜帶PCR產物之選殖株，且為確定其嵌入DNA是否確為 . 因之部分片段，故需對選殖株進行特性分析。特性分析包括嵌入片段 (insert DNA) 大小之分析、選殖株之PCR反應，及嵌入片段之核酸序列分析與比對。各分析步驟之細節分述於下：採用 QIAGEN 公司 (QIAGEN GmbH) 所開發生產之 QIAprep Spin Miniprep Kit 來進行上述準轉型株細胞內的重組質體DNA之抽取，利用核酸計算儀測定OD₂₆₀讀值及DNA之濃度，並測定OD₂₆₀/OD₂₈₀比值以確定DNA之純度，根據載體質體DNA之限制酵素圖譜，選擇適當之限制酵素 (筆者選擇距離嵌入DNA二端最近之EcoRI核酸內限制酵素切位來進行此實驗)，以將嵌入之DNA片段由重組質體 (recombinant plasmid) 中切下，再以1 %瓊脂凝膠在1x TAE緩衝液中進行電泳並觀察其結果。為確定得到之準轉型株所帶之重組質體含有正確之嵌入片段，故將抽出之質體DNA以前述之聚合酵素連鎖反應引子之設計與聚合酵素連鎖反應之PCR反應條件進行PCR反應，並於1 %瓊脂凝膠在1x TAE緩衝液中進行電泳以分析其結果。

準轉型株所帶重組質體嵌入 DNA 之核酸定序 (sequencing) 與其序列分析

為了解選殖至質體PCR[®]II-TOPO之嵌入DNA是否即為*gyrB*基因之部份片段，因此待上述定序分析實驗完成而獲得準轉型株所帶重組質體嵌入DNA的核酸序列後，即可進行此嵌入DNA核酸及胺基酸序列的分析與比對。可利用DNASTAR公司 (DNASTAR, Inc.) 開發之套裝軟體進行核酸及胺基酸序列之分析，並經由網際網路 (World Wide Web)，藉由GCG下的SeqWeb、NCBI及Science期刊的The *Mycoplasma genitalium* Genome Database (<http://www.tigr.org/tdb/CMR/gmg/htmls/SplashPage.html>) 連接其中的資料庫進行核酸及胺基酸序列之比對工作，並再以CLUSTAL軟體進行此嵌入DNA胺基酸序列與其他細菌*gyrB*基因GyrB蛋白之胺基酸序列的比對。

基因庫篩選用核酸探針之製備

經由上述的特性分析，待確定轉型株所攜帶質體內所嵌入之DNA為*gyrB*基因片段後，便可將之製備為基因庫篩選用核酸探針。核酸探針之標識反應採用

Roche Molecular Biochemicals公司所開發之PCR DIG Probe Synthesis Kit進行，唯PCR非放射標識反應中所用之引子改採核酸定序後所得之*gyrB*基因片段序列，重新於其上適當位置設計專一性引子對GBF3: 5' TCTAAAGGTGGTATTCAAG 3' 及 GBR5: 5' CGAAACCTGTACCAAAAAGA 3' (GBF3與GBR5引子相距778 bp)。聚合酵素連鎖反應中反應器所設定之反應程式為: 95 °C 10秒，50 °C 30秒，72 °C 2分鐘，進行35個循環，即完成反應。反應完成後進行電泳分析，經EtBr染色後，觀察聚合酵素連鎖標識反應的結果。此標識完成之核酸探針可直接用於雜配反應，若要長期保存，則保存於-20 °C。此類之探針依據廠商建議，進行雜配反應時以每毫升hybridization solution中使用2 µl之核酸探針為佳。

花生簇葉病病原菌質體基因庫之篩選

以前述方法製備得到 *gyrB* 基因篩選用核酸探針，即對花生簇葉病病原菌質體之基因庫進行篩選。

結果與討論

花生簇葉病病原菌質體 *gyrB* 基因篩選用核醣 4 : 製備及基因庫之篩選

花生簇葉病病原菌質體 *gyrB* 基因篩選用核醣 : 製備

PCR 反應引子之設計

由 GCG 基因資料庫原核生物之 *gyrB* 基因之胺基酸以及核酸序列，經 CLUSTAL 軟體比對後發現除了基因之 3'端部份保守性較低外，在基因中間部份，有多段具有較高保守性之區域，挑選其中保守性最高的六段區域，設計出 8 對 degenerate primer: 分別命名為 GBF1、GBF2、GBR1、GBR2、GBR3 及 GBR4，其序列分列如下：

GBF1 : 5'-AAA MGM CCW GGW ATG TA-3' (17 mers)

GBF2 : 5'-CAT GCW GGW GGW AAA TTT-3' (18 mers)

GBR1 : 5'-CKT ARW GGY AAR ATW GCT TG-3' (20 mers)

GBR2 : 5'-TCR ACR TCR GCA TCD GTC AT-3' (19 mers)

GBR3 : 5'-CAT YTC WCC WAR WCC TTT-3' (18 mers)

GBR4 : 5'-CGH WTW TGW GGA TCC AT-3' (17 mers)

K(G, T); M(A, C); R(A, G); Y(C, T); W(A, T); D(G, A, T); H(A, T, C)

PCR 反應及 PCR 反應產物之選殖

以上述引子相互配對，分別以健康日日春之全 DNA、感染花生簇葉病之日日春全 DNA 為模板，進行 PCR 反應，結果其中只有 GBF2、GBR3 此對引子對可擴增出具專一性之產物。以電泳分析 PCR 產物，顯示在以感染花生簇葉病之日日春全 DNA 為模板所做之 PCR 反應產物，在約 1.4 kb 處，有一明顯亮帶 (圖一)，而此一亮帶在以健康日日春之全 DNA 為模板之 PCR 反應產物中並未出現，表示增幅出來之 DNA 片段為植物菌質體所專有。

接著對此 PCR 反應產物進行選殖，以便於定序分析及後續核酸探針之製

備，經轉型反應後得到之轉型株共有 50 個，取其中一個轉型株命名為 TAGB 3，並將其攜帶之重組質體分別命名為 pTAGB 3，並繼續進行以下之轉型株特性分析，確定所選殖之片段即為 *gyrB* 基因之部分片段。

(一) 轉型株之特性分析

對上述此個轉型株抽取其重組質體 DNA，對其嵌入片段作特性分析。以內限制酵素 *EcoRI* 對 pTAGB 3 進行酵解，並利用水平電泳分析其嵌入片段之大小，在 pTAGB 3 可在 3.9 kb 大小處見到質體 DNA 本身之亮帶。此外，另有約 1.4 Kb 大小之亮帶，可知此嵌入片段即為上述 PCR 產物，所以由內限制酵素作用的結果可確定 pTAGB 3 為選殖成功之轉型株重組質體。

接著再以引子對 GBF2 及 GBR3 為 PCR 反應之引子，pTAGB 3 之重組質體 DNA 為模版進行 PCR 反應，以進一步確定這些重組質體是否帶有正確的嵌入 DNA；PCR 反應完成之後，於 1% 之瓊脂凝膠進行 PCR 反應產物之電泳分析，結果顯示以這個重組質體 DNA 為模版進行 PCR 反應可獲得 1.4 Kb 之產物，由此我們可以再次確定 pTAGB 3 為選殖成功之轉型株重組質體。

之後再針對此重組質體之嵌入片段進行核酸序列分析及比對，以確定此嵌入片段為 *gyrB* 基因片段。由核酸序列分析結果確定重組質體中帶有 1450 bp 之嵌入片段，將此片段之序列與之前所收集 13 種之 *gyrB* 之核酸及胺基酸序列進行比對。比對的結果顯示在胺基酸序列上革蘭氏陰性菌 *E. coli* 有較低的相似性 (identity)，約為 37% 外。與 *Acholeplasma laidlawii*、*Mycoplasma hominis*、*M. gallisepticum*、*M. genitalium* 等其他 Mollicutes 綱革蘭氏陽性菌之 *gyrB* 基因之胺基酸序列有 57%、50%、50%、50% 之相似性。且在 *E. coli* 及其他細菌上 GyrB 蛋白所共有的保守性序列如 GXXGXG ATP-binding motif 也都在 pTAGB 3 重組質體之嵌入片段 DNA 所推衍出的胺基酸序列上發現 (Huang, 1994)，故可推測此片段應為 *gyrB* 基因之部分片段。

依據重組質體 pTAGB 3 核酸定序後所得之 *gyrB* 基因片段序列，重新於其上適當位置設計專一性引子對 GBF3 及 GBR5，以重組質體 pTAGB 之 DNA 為模版進行核酸探針之製作，以利後續由基因庫中進行完整 *gyrB* 基因之篩選

參考文獻

- Agrios, G. N. 1997. Plant diseases caused by mollicutes: phytoplasmas and spiroplasmas. pages 457-470. in: Plant pathology, 4nd Ed. Academic Press, San Diego, CA.
- Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M. H., and Nash, H. A. 1976. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73: 3872-3876.

Klevan L., and Wang, J. C. 1980. Deoxyribonucleic acid gyrase-deoxyribonucleic acid complex containing 140 base pairs of deoxyribonucleic acid and an $\alpha_2\beta_2$ protein core. *Biochemistry* 19: 5229-5234.

Ko, H. C., and Lin, C. P. 1994. Development and Application of cloned DNA probe for a mycoplasma-like organism associate with sweet potato witches' broom. *Phytopathology* 84: 468-473.

Ladefoged, S. A., and Christiansen, G. 1994. Sequencing analysis reveals a unique gene organization in the *gyrB* region of *Mycoplasma hominis*. *J. Bacteriol.* 176: 5835-5842.

Lim, P. O., Sears, B. B., and Klomparens, K. L. 1992. Membrane properties of a plant-pathogenic mycoplasma-like organism. *J. Bacteriol.* 174: 682-686.

Maxwell, A. and Gellert, M. 1984. The DNA dependence of the ATPase activity of DNA gyrase. *J. Biol. Chem.* 259: 14472-14480.

Mizuuchi, K., O'Dea, M. H., and Gellert, M. 1978. DNA gyrase: subunit structure and ATPase activity of the purified enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 5960-5963.

6

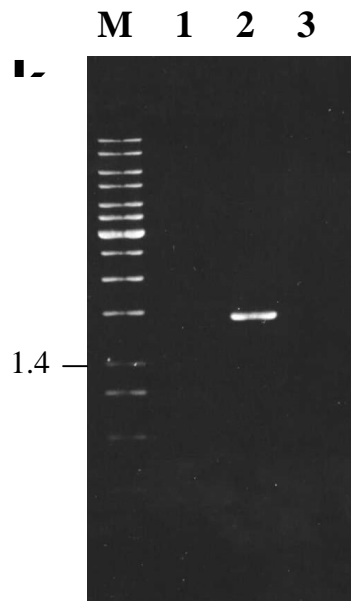
Oppegaard, H. and Sqrum, H. 1996. Cloning and nucleotide sequence of the DNA gyrase *gyrA* gene from the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 1126-1133.

Sinha, R. C. 1979. Lipid composition of mycoplasma-like organisms purified from clover phyllody and aster yellows-affected plants. *Phytopath. Z.* 96: 132-139.

Sinha, R. C., and Madhosingh, C. 1980. Proteins of mycoplasma-like organisms purified from clover phyllody and aster yellows-affected plants. *Phytopath. Z.* 99: 294-300.

Yang, I. L. 1988. Witches' broom diseases of sweet potato and peanut in Taiwan. Ph. D. Thesis. Hokkanido Univ., Japan.

圖表



圖一、利用 primer GBF2 及 primer GBR3 之引子組合對健康日日春及受花生簇葉病病原菌質體感染之日日春全 DNA 進行聚合酵素連鎖反應之產物分析

Fig. 3. Polymerase chain reaction (PCR)-product amplified by primer GBF2 and GBR3 using the total DNA of healthy periwinkle and periwinkle infected with PNWB-phytoplasma as templates. Thirty-five PCR cycles were conducted with following parameters: denaturation for 30 sec at 94 °C, annealing for 30 sec at 50 °C, and extension for 3 min at 72 °C. PCR products were analyzed by electrophoresis in a 1% agarose gel. The DNA templates were extracted from: lane 1, healthy periwinkle; lane 2, periwinkle infected with PNWB-phytoplasma; lane 3, water as negative control. M, 1 kb DNA ladder as molecular weight standards. Size (in kb) of PCR product is shown on the left.