

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

花生簇葉病病原菌質體 gyrB 和 gyrA 基因之選殖與分析

(2/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2313-B-002-059-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：國立臺灣大學植物病理與微生物學系暨研究所

計畫主持人：林長平

報告類型：完整報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 12 月 17 日

花生簇葉病病原菌質體 *gyrB* 和 *gyrA* 基因之選殖

莊景光 林長平

臺北市 國立台灣大學植物病理與微生物學系

聯絡作者：[電子郵件 cplin@ntu.edu.tw](mailto:cplin@ntu.edu.tw)，傳真 02-23661980

摘 要

本研究在進行花生簇葉病 (Peanut witches' broom, PNWB) 病原菌質體 (phytoplasma) *gyrB* 基因選殖時, 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, 再以花生簇葉病病原菌質體 DNA 為模板進行 PCR 反應, 獲得一 1.4 kb 大小之 PCR 產物, 再以此序列設計 PCR 引子對以增幅出篩選用核酸探針, 並藉以篩選花生簇葉病病原菌質體之基因庫, 遂獲得一選殖株重組質體 pPGB 1-4 其 DNA 嵌入片段包含三個完整 open reading frame (ORF)。而藉由 pPGB 1-4 上已知序列及比對其他細菌 *gyrA* 基因核酸序列, 設計 PCR 引子對增幅出 *gyrA* 篩選用探針, 並成功的選殖出另一重組質體 pPGA 2-3, 經核酸序列解序後與 pPGB 1-4 序列共同進行核酸序列分析, 獲得另一完整的 ORF 序列。其中 ORF3 及 ORF4 應分別為花生簇葉病病原菌質體之 *gyrB* 及 *gyrA* 基因。由南方氏雜合反應的結果可發現在花生簇葉病病原菌質體中應僅具有單一套 (single copy number) 之 *gyrB* 基因及 *gyrA* 基因。而由 RT-PCR 反應的結果可發現, 在花生簇葉病病原菌質體中 *gyrB* 及 *gyrA* 基因有可能是以 *gyrB-gyrA* cotranscription 的方式進行轉錄。

關鍵詞： *gyrB* 基因、 *gyrA* 基因、花生簇葉病

緒 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 (1)。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 (13; 20; 21)。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 (23)。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。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(5)，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)(9)。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 (16, 15)。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。

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(23)。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(10)，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 (probe) 之製備

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/>) 基因資料庫中收集包括 *Acholeplasma laidlawii*、*Bacillus* sp.、*Mycoplasma arthritidis*、*Mycoplasma genitalium*、*Mycoplasma gallisepticum*、*Mycoplasma hominis*、*Mycoplasma pneumoniae*、*Spiroplasma citri*、*Streptomyces spheroides*、*Staphylococcus aureus*、*Streptococcus pneumoniae* 及 *Escherichia coli* (GeneBank accession number : AF167102, AB010081, U83664, U09251, L35044, X77529, X53555, Z19108, Z17305, M86227, X83917及D87842) 等細菌之DNA gyrase酵素B亞單位 (DNA gyrase B subunit) 之胺基酸序列，利用 CLUSTAL (6)軟體進行比對，並參照前人所比對之結果 (12) 設計出長約20 bp

大小之寡核苷酸 (oligonucleotides) 引子GBF2 : 5' CATGCWGGWGGWAAATTT 3' 及GBR3 : 5' CATYTCWCCWARWCCTTT 3'。PCR反應中兩引子各0.5 μ M、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 $^{\circ}$ C 30秒，50 $^{\circ}$ C 30秒，72 $^{\circ}$ C 3分鐘。並利用QIAquick PCR purification kit(QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) 及TOPO TA Cloning[®] Kit (Invitrogene Corporation, San Diego, CA) 進行PCR產物純化及選殖。所獲得之選殖株重組質體進行PCR產物嵌入片段DNA核苷酸序列之譯讀。利用選殖株重組質體(pCR[®]II-TOPO)嵌入片段之上、下游之通用引子 (universal primer) 對，根據Sanger (18)之雙股去氧核糖核酸鍊終止(dideoxy chain termination)方法，使用ABI PRISM[™] BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit和ABI PRISM[™] 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer, U.S.A.) 核酸自動定序分析儀進行之。並依已定出序列之片段的3'端序列，設計出約20 mer之引子，以便往3'端繼續進行延伸定序 (圖一)，至所有的核酸序列均被解讀出來為止。

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' CGAAACCTGTACCAAAGA 3' (GBF3與GBR5引子相距778 bp)。

花生簇葉病病原菌質體 *gyrB* 基因之基因庫篩選

花生簇葉病病原菌質體基因庫乃採用Stratagene公司 (Stratagene, LA Jolla, CA) 所開發之Predigested lambda Zap[®] II/ *Eco*RI/ CIAP cloning kit及Gigapack II packaging extract進行，以前述方法製備得到*gyrB*基因篩選用核酸探針後，即可對花生簇葉病病原菌質體之基因庫進行篩選。而雜合反應溫度為68 °C。針對由基因庫篩選得到之選殖株重組質體DNA利用pBluescript SK(-)上所帶之通用引子對進行嵌入片段DNA之核苷酸進行定序分析。定序結果並以DNASTAR軟體 (DNASTAR, Inc.) 及連結NCBI基因資料庫對嵌入DNA之核酸序列進行分析，設定ATG, GTG及TTG為起始密碼，以TGA, TAG及TAA為終止密碼 (11)，找出可能之ORF (open reading frame)。

花生簇葉病病原菌質體 *gyrA* 基因篩選用核酸探針之製備及基因庫之篩選

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 (12, 17)。爲了進一步選殖出完整的 *gyrA* 基因，遂利用已解序完成的 *gyrB* 基因下游序列設計一股正股引子 (forward primer) GAF1 : 5' AAAGGGTTAGGAGAAAT 3'，並至 GCG 基因庫中收集包括 *Bacillus* sp.、*Mycoplasma genitalium*、*Staphylococcus aureus*、*Streptococcus pneumoniae* 及 *E. coli* (GenBank accession number : AB010081, U09251, D10489, AF053121 及 X06373) 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，所設計的反股引子為 GAR2 : 5' GTBGGRAARTCWGGWCC 3' 其序列位於 *gyrA* 上，並利用此引子對 GAR1/GAR2，進行 PCR 反應：兩引子各 0.5 μ M 而反應溫度改為為: 94 °C 10 秒鐘，50 °C 5 秒鐘，72 °C 30 秒鐘進行 35 個循環。並進行 PCR 反應產物之選殖及定序分析。再利用定序後所得之 *gyrA* 基因部分序列於適當位置重新設計專一性引子對 GAR3 : 5' GGATTATCTAATCAAGAACG 3', GAR3 : 5' CATTAAATCTTGAGTTTCTA 3' 同樣以 PCR DIG 非放射標識的方式進行 *gyrA* 基因核酸探針之製備。並進行基因庫之篩選，及嵌入片段 DNA 之核苷酸定序分析。

南方氏轉漬 (Southern blotting) 與北方式轉漬 (northern blotting) 及雜配反應 (hybridization)

取 5 μ g 健康及感染花生簇葉病之植物全 DNA，分別以 10 單位之 *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Sac*I, *Xba*I, *Xho*I 核酸內限制酵素 (Roche Molecular Biochemicals) 進行酵解，共進行 6 小時，再於 0.8 %瓊脂凝膠中進行水平式電泳，並將 DNA 轉漬至 Nylon 濾膜，隨後進行雜配及呈色反應(3, 10)。

植物體全 RNA 之抽取乃採用 Yeh 等人 (24) 的方法，雜配反應仍採用非放射性之 DIG-dUTP 標示之 DNA 探針，唯 RNA 再進行轉漬時改用 20x SSC 且呈色受質改為 CDP-*Star*TM chemiluminescent detection reagent(TROPIX, Inc. Bedford,

MA)。南方氏與北方式轉漬及雜配反應中雜合反應溫度為 68 °C，核酸探針為前述 *gyrB* 及 *gyrA* 基因篩選用核酸探針。

反轉錄聚合酵素連鎖反應 (reverse transcription PCR, RT-PCR)

將 5 µg 花生簇葉病病原菌質體 RNA 溶於 4 µl nuclease-free H₂O 中以 10 unit DNase I, RNase-free (Roche Molecular Biochemicals) 於 37 °C 處理 15 分鐘，再經 68°C 處理 10 分鐘，並立即置於冰上待用。再依序加入 nuclease-free H₂O (使反應總體積為 20 µl)、4 µl 的 5x Reaction Buffer、1.25 µM 的 dNTPs mixture、反股引子 2.5 µM (*gyrB* 基因區域 SGBR2 : 5' AGCTTCTTGCGGATTCTC 3' 及 *gyrB-gyrA* 基因區域 SGAR8 : 5' AAAGTGTAGGTTCTTTCTC 3')，並加入 200 unit M-MLV reverse transcriptase (Promega Cooperation) 或僅加入 1 µl nuclease-free H₂O 作為檢驗 RNA 中有無 DNA 殘留的控制組，於 37 °C 下反應 1 小時。PCR 反應中正、反股引子對 (SGBF2 : 5' CACTTG GTTTACAGTGGA 3' / SGBR2, SGBF5 : 5' TATTTTGCTCAACCTCCT 3' / SGAR8) 各 0.5 µM，並分別加入 1 µl 上述反轉錄反應產物或分別加入 50 ng 健康及受花生簇葉病病原菌質體感染植物全 DNA 作為 PCR 反應的對照組。反應條件為: 94 °C 10 秒鐘，50 °C 5 秒鐘，72 °C 30 秒鐘進行 30 個循環。反應完成後，於 1% 瓊脂凝膠 (1x TAE 緩衝液) 進行電泳分析。

結 果

花生簇葉病病原菌質體 *gyrB* 基因之基因庫篩選

篩選結果，得到 5 個重組質體。先選取其中之一 pPGB 1-4 進行嵌入 DNA 全長之核酸定序分析。定序結果 pPGB 1-4 包含 5308 bp 嵌入片段，發現一個 tRNA^{Gln} 及 3 個 ORF，分別為 ORF1，ORF2 及 ORF3。其中，tRNA^{Gln}、ORF1、ORF2 是位於 ORF3 所位核酸序列之對應股上。以 ORF1 及 ORF2 之核酸及胺基酸序列於連結 NCBI 資料庫進行比對，並未發現有任何已知基因與之有相似性。ORF3 之核酸序列共有 1948 bp，共可轉譯成有 648 個胺基酸，基因產物估計約為 73.5 kD 的蛋白質，轉譯起始密碼為 ATG，終止密碼為 TAA。ORF 中 A+T 值為 71.91%，G+C 值為 28.09%，其核酸組成為 16.18% 的 G，37.7% 的 A，34.21% 的 T，11.92% 的 C；其密碼利用性（codon usage）如表一所示。而在胺基酸的利用上，三個 ORF 皆無發現有以 UGA 為 tryptophan 密碼的情形，與前人的研究相符（25）。將 ORF3 之核酸序列轉譯成胺基酸序列與之前於 GCG 基因庫中所收集到各細菌的之 *gyrB* 基因進行比對，除與 *E. coli* 之 *gyrB* 基因胺基酸序列有較低約為 37% 之相似度（identity）外；其他與 *Acholeplasma laidlawi*、*Mycoplasma arthritidis*、*Mycoplasma gallisepticum*、*Mycoplasma genitalium*、*Mycoplasma hominis*、*Mycoplasma pneumoniae*、*Spiroplasma citri*、*Bacillus subtilis*、*Staphylococcus aureus*、*Staphylococcus pneumoniae* 和 *Streptomyces spheroides* 在胺

基酸序列上亦分別有 57 %、47 %、49 %、49 %、49 %、48 %、50 %、54 %、53 %、51 % 和 46 % 的相似度。並發現此 ORF3 所推衍出之胺基酸序列，包含了在 *E. coli* 及其他細菌上所發現共同具有的保守性區域例如 *E. coli* 在第 114、117、119 位置的 GXXGXG ATP-binding motif 或能與 ATP triphosphate 接觸的第 46、103、335、及 337 位置胺基酸 N, K, Q, K 或與 ATP ribose ring 上 2'-hydroxyl 發生反應的第 5 位置胺基酸 Y 及可與 ATP 上 adenine 官能基接觸的 109 和 73 位置的胺基酸 Y, D(8) 皆能在 ORF3 所推衍出的胺基酸相對位置上發現。此外，在 ORF3 之起始密碼 ATG 之上游約 20 至 25 個核酸間，有與植物菌質體 (14) 及一般原核生物的 16S rRNA 3' 端的序列互補，即類似 Shine-Dalgarno 序列 (Shine-Dalgarno sequence)，亦即核糖體鍵結位置 (ribosomal binding site, RBS) 的存在 (19)。而在 ORF3 核酸序列下游約 84 bp 處有發現另一約 203 bp 序列具 ATG 起始密碼，而結尾處為選殖時之 *EcoRI* 內限制酵素辨識切位，疑似為另一 ORF 的部分核酸序列。經連結 NCBI 基因資料庫與其他細菌之基因進行比較，發現此 203 bp 核酸序列推衍所得之胺基酸序列與 *Ureaplasma urealyticum*、*Mycoplasma genitalium* 的 *gyrA* 基因胺基酸序列有 49 %、45% 的相似性。

花生簇葉病病原菌質體 *gyrA* 基因核酸探針之製備及基因庫篩選

對選殖株 pPGA 2-3 嵌入片段 DNA 進行核酸定序及分析後，發現前述選殖株 pPGA 2-3 包含 3840 bp 嵌入片段。將選殖株 pPGB 1-4 和 pPGA 2-3 之嵌入 DNA

共同再以 DNASTAR 軟體對嵌入 DNA 之核酸序列進行分析，分析結果除前述的 tRNA^{Gln} 及 3 個 ORFs 外，另發現一個新的 ORF，稱為 ORF4。整個 ORF4 之核酸序列共有 2541 bp，轉譯成胺基酸序列後共有 846 個胺基酸，基因產物估計約為 95.8 kD 的蛋白質，轉譯起始密碼為 ATG，終止密碼為 TAA。ORF 中 A+T 值為 72.65%，G+C 值為 27.35%，其核酸組成為 15.7% 的 G，39.51% 的 A，33.14% 的 T，11.65% 的 C。其密碼利用性如表二所示，而在胺基酸的利用上，亦並無發現有以 UGA 為 tryptophan 密碼的情形。將 ORF4 之核酸序列轉譯成胺基酸序列與之前於 GCG 基因庫中所收集到各細菌的之 *gyrA* 基因進行比對，除與 *E. coli* 之 *gyrA* 基因胺基酸序列有較低約為 36% 之相似度 (identity) 外；其他與 *Mycoplasma genitalium*、*Bacillus subtilis*、*Staphylococcus aureus* 和 *Staphylococcus pneumoniae* 在胺基酸序列上亦分別有 40%、42%、41% 和 41% 的相似度。此 ORF4 所推衍出之胺基酸序列，包含了在 *E. coli* 及其他細菌上共同具有的保守性區域例如相對於 *E. coli* 在第 112 位置，與 GyrA 蛋白催化兩股 DNA 分子形成鍵結有關的 tyrosine 胺基酸 (8) 皆能在 ORF4 所推衍出的胺基酸上發現。此外，在 ORF4 之起始密碼 ATG 之上游約 7 至 11 個核酸間，有類似 Shine-Dalgarno 序列的存在。以上包含 tRNA^{Gln} 及 ORF1、ORF2、*gyrB* 與 *gyrA* 之基因序列已登錄至 GeneBank 資料庫，登錄號碼 (accession number) 為 AF263924。

南方氏和北方式轉漬法及雜配反應

南方氏雜配反應部分，以 *gyrB* 基因為核酸探針，核酸內限制酵素 *EcoRI* 酵解者，可在約 5 kb 之 DNA 片段處產生訊號；以 *HindIII* 酵解者，可在約 3 kb 之 DNA 片段處產生訊號，而以其餘幾種核酸內限制酵素酵解者訊號約皆在 10 Kb 以上之 DNA 片段處產生（圖二）。另以 *gyrA* 基因為核酸探針部分以 *EcoRI* 酵解者，可在約 21 kb 之 DNA 片段處產生訊號；以 *HindIII* 酵解者，可在約 3 kb 之 DNA 片段處產生訊號，而以其餘幾種核酸內限制酵素酵解者訊號約皆在 10 Kb 以上之 DNA 片段處產生（圖二）；而 *gyrB* 及 *gyrA* 基因探針對健康日日春之全 DNA 則沒有任何雜配訊號。由上述結果，我們可以推測 *gyrB* 及 *gyrA* 基因在花生簇葉病病原菌質體應是 single copy 或 low copy number。而以 *gyrB* 或 *gyrA* 基因核酸探針對健康日日春之全 RNA 雖無任何訊號產生但對於花生簇葉病病原菌質體感染之日日春之全 RNA 卻無十分明確的訊號產生。

反轉錄聚合酵素連鎖反應

在 *gyrB* 基因部分，以 SGBF2、SGBR2 為引子對進行 RT-PCR 反應，可增幅出 731 bp 之產物（圖三）。而以健康日日春全 RNA 或不加入反轉錄酵素的控制組及以健康日日春全 DNA 進行 PCR 反應皆不會有產物。以 SGBF5、SGAR8 為引子對進行 RT-PCR 反應，可增幅出 943 bp 之產物（圖三）。另外，RT-PCR 反應時以健康日日春全 RNA 作為模版或不加入反轉錄酵素的控制組及進行 PCR 反應時以健康日日春全 DNA 作為模版之控制組皆不會有預期大小產物的產生。

討 論

本實驗中，採用之基因選殖策略為先收集其他原核細菌 *gyrB* 及 *gyrA* 基因之核酸及胺基酸序列。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。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。

利用引子對 GAF1, GAR2 可以 PCR 增幅出預期大小約 1 kb 之 DNA 片段，再經進行 PCR 產物選殖後，得一選殖株重組質體 pTAGA 3。對 pTAGA 3 進行嵌入片段解序。確定所增幅出之產物大小為 938 bp，其中包含於先前進行 *gyrB* 基因選殖時所獲得之 *gyrB* 基因 3'端及其下游至內限制酵素 *EcoRI* 辨識切位區域共約 427 bp，以及內限制酵素 *EcoRI* 辨識切位下游約 511 bp。而此一 511 bp 核苷酸序列與之後於 *gyrA* 基因選殖時所獲得選殖株重組質體 pPGA 2-3 之 DNA 嵌入片段一側內限制酵素 *EcoRI* 辨識切位下游核苷酸序列完全相符，因此推論重組質體 pPGB 1-4 及 pPGA 2-3 所包含之 DNA 嵌入片段應為一連續之核苷酸序列且中間具有一內限制酵素 *EcoRI* 辨識切位。

花生簇葉病病原菌質體的 *gyrB* 及 *gyrA* 基因於核酸序列排列上，*gyrA* 基因位於 *gyrB* 基因終止密碼下游約 84 個鹼基處。此一 *gyrB-gyrA* 基因形成 couplet 的情形也與其它革蘭氏陽性菌間如 *Bacillus subtilis* 相距 214 個鹼基、*Staphylococcus*

aureus 相距 39 個鹼基及 *Mycoplasma pneumoniae* 上 1 個鹼基重疊的情形相同

(8)，而與在革蘭氏陰性菌如 *E. coli*、*Pseudomonas putida* 上 *gyrB* 及 *gyrA* 二基因相隔數幾千個鹼基 (12) 的分佈情形不同。此外，本實驗中所選殖到之花生簇葉病病原菌質體 *gyrB* 及 *gyrA* 基因推衍所得之 GyrB 及 GyrA 蛋白與其革蘭氏陽性菌及 Mollicutes 綱細菌之 GyrB 及 GyrA 蛋白比較，分別有 46 ~ 45 % 及 40 ~ 41 % 在胺基酸上之相似度 (結果請參閱表三及表四)。其中 GyrA 蛋白保守性區域集中於蛋白質 N 端，導致各 GyrA 蛋白間保守性較低。另外，在 GyrB 蛋白間的比較上，在本次所選殖到花生簇葉病病原菌質體之 GyrB 蛋白序列中也並未發現一段不存在於 *Bacillus subtilis*, *Borrelia burgdorferi*, *Haloferax* sp., *Mycoplasma pneumoniae* 及 *Staphylococcus aureus* 等革蘭氏陽性菌，只廣泛存在於各革蘭氏陰性菌如 *E. coli*, *Pseudomonas putida* 間約 150 個胺基酸序列的嵌入片段 (8)。可再一次佐証，所選殖到者應為花生簇葉病病原菌質體之 *gyrB* 及 *gyrA* 基因。並且也與前人於 16S rRNA 序列分析中指出 phytoplasma 應屬革蘭氏陽性菌的結論相符。

但除了分別與其它細菌之 GyrB 及 GyrA 蛋白有較高之相似度外。另外，也分別與其它細菌之 ParE 及 ParC 蛋白存在著顯著之相似性 (結果請見表三及表四)。*parE* 及 *parC* 基因產物則為 topoisomerase IV 蛋白，而 *gyrB* 及 *gyrA* 基因產物為 Gyrase 蛋白，也就是 topoisomerase II 蛋白兩者同屬於第二類 (Type II) 的 topoisomerase，在基因組成及蛋白結構上相當類似，在 *E. coli* 上 GyrB 及 GyrA 蛋白與 ParE 與 ParC 蛋白甚至分別有 52% 及 41% 的相似度。在 *Mycoplasma*

genitalium 的研究上，學者甚至利用 *gyrA* 基因的 degenerate 引子對來進行 *parC* 基因的選殖 (2)。在對花生簇葉病病原菌質體之 *gyrB* 及 *gyrA* 基因之胺基酸序列分別與其它細菌之 *gyrB*、*gyrA* 及 *parE*、*parC* 基因胺基酸序列比對相似度時。花生簇葉病病原菌質體之 GyrB 及 GyrA 蛋白與其它革蘭氏陽性及陰性菌之 GyrB 及 GyrA 蛋白相對於 ParE 及 ParC 蛋白，都有較高的相似度 (結果請參閱表三及表四)。據此，我們可作一個推測，本實驗中選殖所得，應為花生簇葉病病原菌質體之 *gyrB* 及 *gyrA* 基因，而非 *parE* 及 *parC* 基因。

在以南方氏轉漬及雜配法確定 *gyrB* 及 *gyrA* 基因於花生簇葉病病原菌質體基因體上所存在套數的分析中，不論以 *gyrB* 或 *gyrA* 基因之探針所作的反應，以 7 種內限制酵素分別處理所得之雜配訊號，皆為單一訊號，顯示在花生簇葉病病原菌質體中，*gyrB* 及 *gyrA* 基因應是 single copy 或 low copy number，此結果與其它學者在報告中所提稱 *gyrB* 及 *gyrA* 基因為 single copy 之基因特性相符 (22)。

在對花生簇葉病病原菌質體的 *gyrB* 及 *gyrA* 基因轉錄產物所作的分析上。北方式雜配反應中，雜配訊號在非預期大小，約 4 kb RNA 處開始出現。而在反轉錄聚合酵素連鎖反應中若以位於 *gyrA* 基因起始密碼下游約 500bp 處之反股引子搭配另一位於 *gyrB* 基因上，相距 *gyrA* 基因起始密碼約 440bp 之正股引子，利用 RT-PCR 的方式可增幅出一段跨於 *gyrB* 及 *gyrA* 基因轉錄產物的 cDNA。這項結果使我們得以推論，在花生簇葉病病原菌質體上，*gyrB* 及 *gyrA* 基因有可能是如同在其它革蘭氏陽性菌如 *Haloferax volcanii* (7) 或 *Mycoplasma gallisepticum* (4)

是以 cotranscription 的方式轉錄出 *gyrB-gyrA* polycistronic mRNA 形式之 transcript 。

引用文獻

1. 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.
2. Bailey, C. C., Younkings, R., Huang, W. M., and Bott, K. F. 1996. Characterization of genes encoding topoisomerase IV of *Mycoplasma genitalium*. Gene 168: 77-80.
3. Chen, M. F. and Lin, C. P. 1997. DNA probes and PCR primers for the detection of a phytoplasma associated with peanut witches' broom. Eur. J. Plant Pathol. 103: 137-145.
4. Forsyth, M. H., Sayed, A. S., and Geary, S. J. 1995. Sequence and transcriptional analysis of the genes encoding the class-II topoisomerase of *Mycoplasma gallisepticum*. Gene 163: 161-162.
5. 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.
6. Higgins, D. G., and Sharp, P. M. 1989. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* 73: 237-244.
 7. Holmes, M. L., Nuttall, S. D., and Dyall-Smith, M. L. 1991. Construction and use of halobacterial shuttle vectors and further studies on *Haloferax* DNA gyrase. *J. Bacteriol.* 173: 3807-3813.
 8. Huang, W. M. 1994. Type II DNA Topoisomerase Genes. pages 201-225 in: *Advances in Pharmacology, DNA Topoisomerases*. Vol. 29. Liu, L. F., ed., Academic Press, San Diego, CA.
 9. 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.
 10. Ko, H. C., and Lin, C. P. 1994. Development and Application of cloned DNA probe for a mycoplasma-like organism associated with sweet potato withes'

- broom. *Phytopathology* 84: 468-473.
11. Kozak, M. Y. 1983. Comparison of initiation of protein synthesis in prokaryotes, eucaryotes, and organelles. *Microbiol. Rev.* 47:1-45.
 12. 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.
 13. Lim, P. O., Sears, B. B., and Klomparens, K. L. 1992. Membrane properties of a plant-pathogenic mycoplasmalike organism. *J. Bacteriol.* 174: 682-686.
 14. Lim, P. O., and Sears, B. B. 1989. 16s rRNA sequence indicates that plant-pathogenic mycoplasmalike organisms are evolutionarily distinct from animal mycoplasmas. *J. Bacteriol.* 171: 5901-5906.
 15. Maxwell, A. and Gellert, M. 1984. The DNA dependence of the ATPase activity of DNA gyrase. *J. Biol. Chem.* 259: 14472-14480.

16. 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.

17. 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.

18. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.

19. Shine, J., and Dalgarno, L. 1974. The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementary to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 1342-1346.

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

21. 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.
22. Venkateswaran, K., Dohmoto, N., and Harayama, S. 1998. Cloning and nucleotide sequence of the *gyrB* gene of *Vibrio parahaemolyticus* and its application in detection of this pathogen in shrimp. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 681-687.
23. Yang, I. L. 1988. Witches' broom diseases of sweet potato and peanut in Taiwan. Ph. D. Thesis. Hokkanido Univ., Japan.
24. Yeh, K.-W., Juang, R.-H., and Su, J.-C. 1991. A rapid and efficient method for RNA isolation from plants with high carbohydrate content. *Focus* 13: 102-103.
25. Yu, Y. L., Yeh, K. W., and Lin, C. P. 1998. An antigenic protein gene of a phytoplasma associated with sweet potato witches' broom. *Microbiology* 144: 1257-1262.

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. The complete nucleotide sequence of the 5.0 kb insert DNA of pPGB 1-4, one of the *in vivo* excised recombinants carrying three complete open reading frames (ORFs), ORF1, ORF2 and ORF3 were determined. And in order to clone and analyse the *gyrA* gene, a specific primer GAF1 was designed based on the ORF3 DNA sequence, and the other degenerate primer GAR4 was

designed according to the sequences of the *gyrA* gene of *E. coli*, *Bacillus* sp., *S. aureus*, *S. pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. Total DNA from diseased periwinkle infected with phytoplasma associated with peanut witches' broom (PNWB) was prepared for PCR reaction to amplify a 995 bp-PCR fragment of the *gyrA* gene of the phytoplasma. A 462 bp-PCR product was then amplified by using the primers GAF3, GAR3 synthesized according to the sequences of the 995 bp-PCR fragment and used as a nucleic acid probe for the screening of the Lambda ZAP II genomic library of PNWB-phytoplasma.

The complete nucleotide sequence of the 4.0 kb insert DNA of pPGA 2-3, one of the *in vivo* excised recombinants carrying a complete ORF, ORF2 was determined. The genes organization and the nucleotide sequence in conserved region of the ORFs are similar to those of the homologous *gyrB* and *gyrA* genes of other organisms. According to the nucleic acid and amino acid sequence analyses, these genes were identified as the putative *gyrB* and *gyrA* genes.

According to the results of Southern hybridization analysis by using the probe for *gyrB* or *gyrA*, it is suggested that only one copy of *gyrB* and *gyrA* may exist in PNWB-phytoplasma. However, according to the results of Northern hybridization and RT-PCR analyses, it is suggested that *gyrB* and *gyrA* may be cotranscribed as a polycistronic mRNA in PNWB-phytoplasma.

Key words: *gyrB* gene, *gyrA* gene, peanut witches' broom

圖一、對 pPGB 1-4、pTAGA 3 和 pPGA 2-3 選殖株嵌入 DNA 片段進行核苷酸定序之策略

Fig. 1. Sequencing strategy and the location of the open reading frames in the 5.0 kb, 1.0 kb and 4.0 kb inserts of pPGB 1-4 (A), pTAGA 3 (B) and pPGA 2-3 (C). The directions of transcription of the open reading frames are shown above the bars. Arrows below the bar indicated the direction and the extent of sequencing.

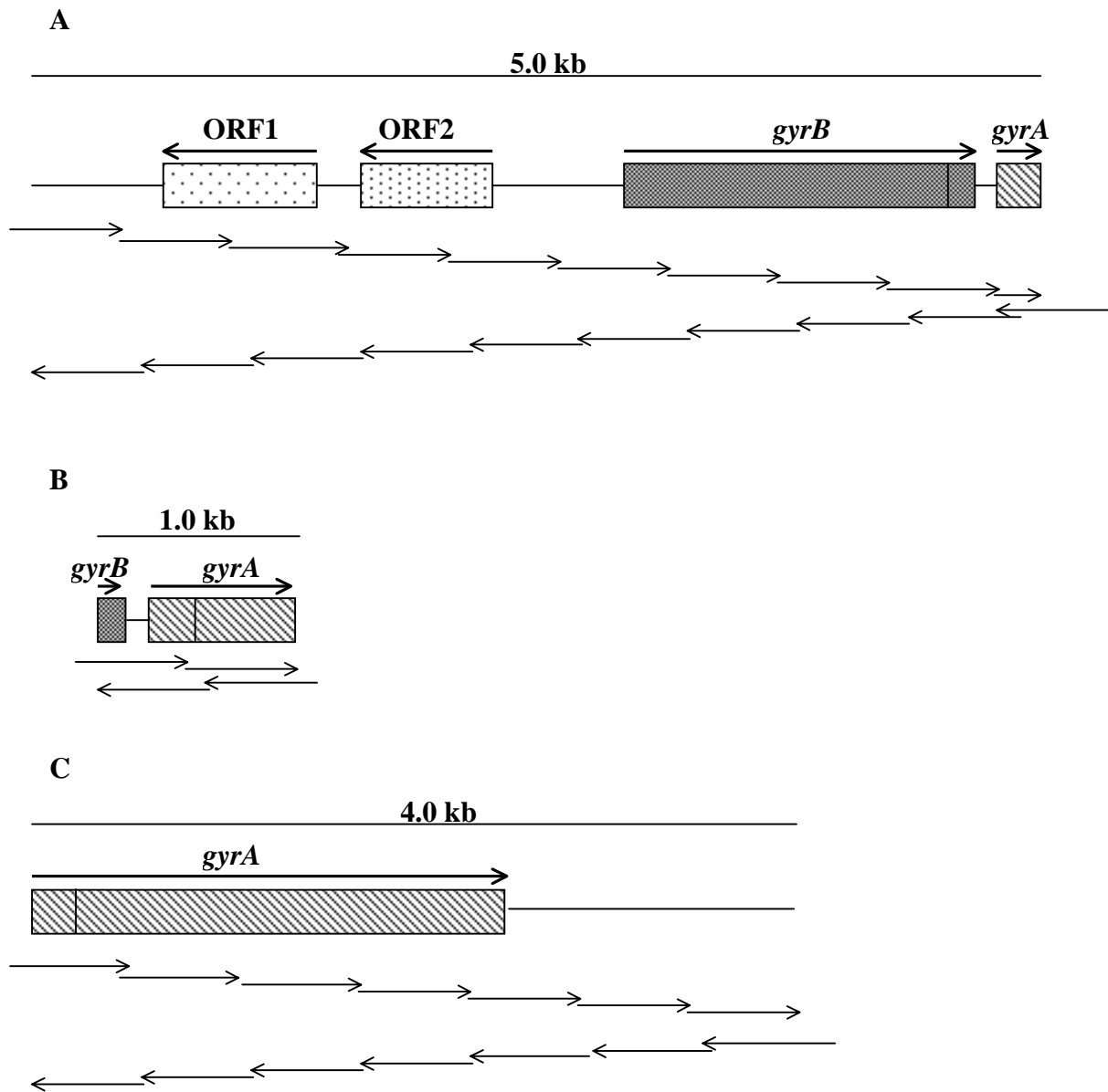


Fig1.

圖二、對健康及受花生簇葉病病原菌質體感染之日日春全 DNA 以不同內限制酵素酵解後以 *gyrB* 基因核酸探針進行南方氏雜配分析

Fig. 2. Southern blot analysis of total DNA (5 μ g per lane) prepared from healthy periwinkle digested with restriction enzyme *EcoRI* (lane 1) and from diseased periwinkle infected with PNWB-phytoplasma digested with restriction enzyme *EcoRI* (lane 2), *BamHI* (lane 3), *HindIII* (lane 4), *KpnI* (lane 5), *SacI* (lane 6), *XbaI* (lane 7), *XhoI* (lane 8). Hybridizations were conducted at 68 °C using the PCR DIG-labeled *gyrB* gene probes (A) and *gyrA* probes (B). Sizes (in kb) of the hybridization signals are shown on the left.

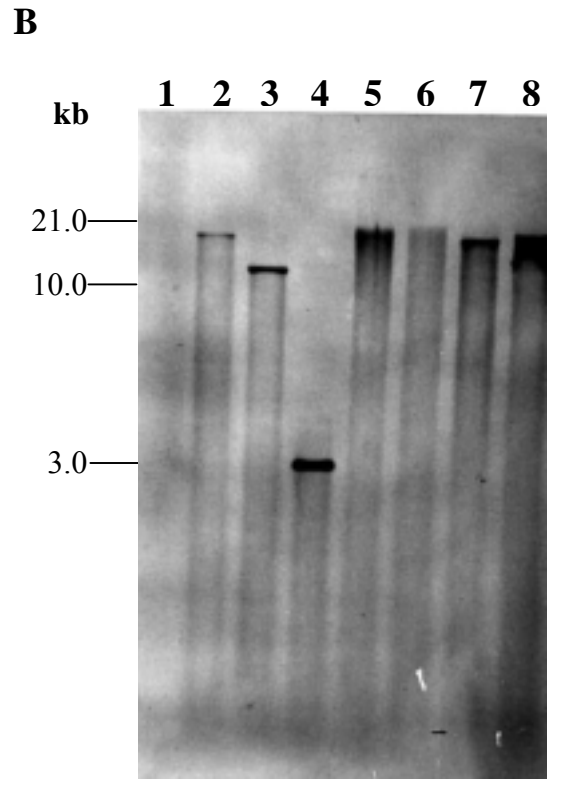
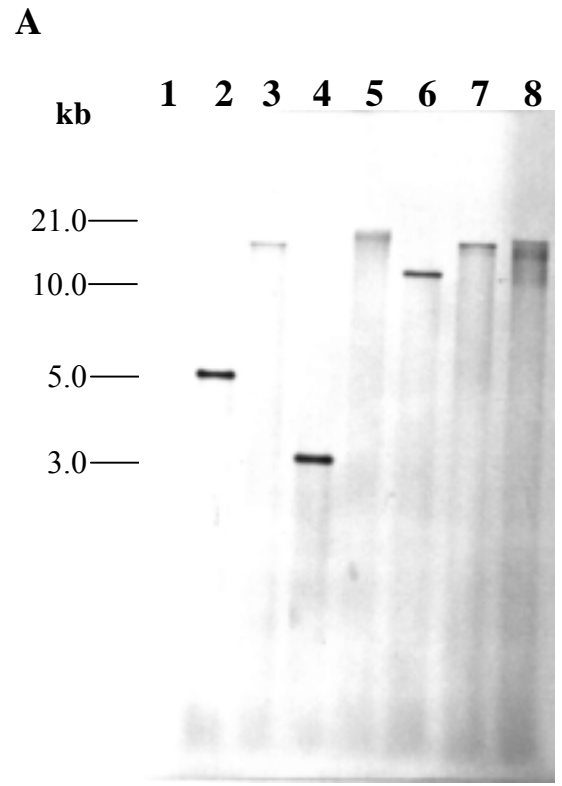


Fig 2.

圖三、以 RT-PCR 分析 *gyrB* 基因及 *gyrB*、*gyrA* 基因之共同轉錄產物

Fig. 3. Transcription of the *gyrB* gene and cotranscription of the *gyrB* and the adjacent *gyrA* gene shown by RT-PCR. For each amplification, a pair of two synthetic oligonucleotide primers was chosen. A, this pair was located in *gyrB* gene (*gyrB*: bp 3393–3410 for the 5' primer SGBF2 and 4106–4123 for the 3' primer SGBR2). B, one primer was located in the 5' region of the *gyrB* gene and one in the 3' region of the *gyrA* gene (*gyrB*-*gyrA* hybrid: bp 4598–4615 of the *gyrB* gene for 5' primer SGBF5 and bp 5522–5540 of the *gyrA* gene for the 3' primer SGAR8). Negative controls for RT-PCR were run in the absence of reverse transcriptase (lanes 2, 4). Lanes 1-2 show the amplification products from healthy periwinkle RNA and lanes 3-4 from RNA purified from periwinkle infected with PNWB-phytoplasma. DNA templates were extracted from: healthy periwinkle (lane 5), periwinkle infected with PNWB-phytoplasma (lane 6) as positive controls for RT-PCR. PCR products were separated in a 1.0 % agarose gel. Sizes (in bp) of PCR product is shown on the left.

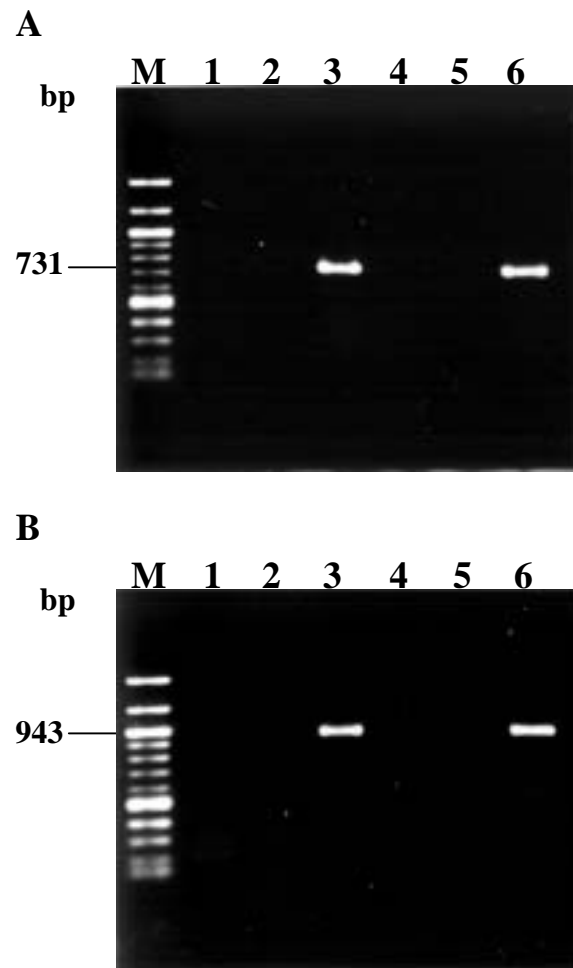


Fig 3.

表一、花生簇葉病原菌質體 *gyrB* 基因之密碼應用性

Table 1. Codon usage in the PNWB-phytoplasma *gyrB* gene

| 1st base | Codon with 2nd base | | | | | | | | 3rd base |
|----------|---------------------|-------------------|------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|----------|
| | U | | C | | A | | G | | |
| | Amino Acid | No. of occurrence | Amino Acid | No. of occurrence | Amino Acid | No. of occurrence | Amino Acid | No. of occurrence | |
| U | Phe (F) | 24 | Ser (S) | 21 | Tyr (Y) | 29 | Cys (C) | 3 | U |
| | Phe (F) | 6 | Ser (S) | 2 | Tyr (Y) | 1 | Cys (C) | 0 | C |
| | Leu (L) | 50 | Ser (S) | 4 | TER ^a | 1 | OPA ^b | 0 | A |
| | Leu (L) | 4 | Ser (S) | 1 | TER | 0 | Trp (W) | 3 | G |
| C | Leu (L) | 4 | Pro (P) | 13 | His (H) | 11 | Arg (R) | 4 | U |
| | Leu (L) | 0 | Pro (P) | 2 | His (H) | 0 | Arg (R) | 1 | C |
| | Leu (L) | 1 | Pro (P) | 3 | Gln (Q) | 24 | Arg (R) | 3 | A |
| | Leu (L) | 0 | Pro (P) | 3 | Gln (Q) | 3 | Arg (R) | 1 | G |
| A | Ile (I) | 49 | Thr (T) | 22 | Asn (N) | 37 | Ser (S) | 11 | U |
| | Ile (I) | 3 | Thr (T) | 0 | Asn (N) | 8 | Ser (S) | 1 | C |
| | Ile (I) | 10 | Thr (T) | 9 | Lys (K) | 60 | Arg (R) | 13 | A |
| | Met (M) | 11 | Thr (T) | 1 | Lys (K) | 2 | Arg(R) | 2 | G |
| G | Val (V) | 16 | Ala (A) | 31 | Asp (D) | 30 | Gly (G) | 21 | U |
| | Val (V) | 1 | Ala (A) | 3 | Asp (D) | 2 | Gly (G) | 6 | C |
| | Val (V) | 9 | Ala (A) | 6 | Glu (E) | 39 | Gly (G) | 7 | A |
| | Val (V) | 3 | Ala (A) | 4 | Glu (E) | 6 | Gly (G) | 4 | G |

^a TER, termination codon

^b opal codon

表二、花生簇葉病原菌質體 *gyrA* 基因之密碼應用性Table 2. Codon usage in the PNWB-phytoplasma *gyrA* gene

| 1st base | Codon with 2nd base | | | | | | | | 3rd base |
|----------|---------------------|-------------------|------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|----------|
| | U | | C | | A | | G | | |
| | Amino Acid | No. of occurrence | Amino Acid | No. of occurrence | Amino Acid | No. of occurrence | Amino Acid | No. of occurrence | |
| U | Phe (F) | 28 | Ser (S) | 28 | Tyr (Y) | 18 | Cys (C) | 1 | U |
| | Phe (F) | 4 | Ser (S) | 3 | Tyr (Y) | 3 | Cys (C) | 3 | C |
| | Leu (L) | 60 | Ser (S) | 6 | TER ^a | 0 | OPA ^b | 0 | A |
| | Leu (L) | 7 | Ser (S) | 2 | TER | 1 | Trp (W) | 0 | G |
| C | Leu (L) | 8 | Pro (P) | 14 | His (H) | 10 | Arg (R) | 14 | U |
| | Leu (L) | 1 | Pro (P) | 0 | His (H) | 3 | Arg (R) | 5 | C |
| | Leu (L) | 2 | Pro (P) | 1 | Gln (Q) | 41 | Arg (R) | 5 | A |
| | Leu (L) | 0 | Pro (P) | 4 | Gln (Q) | 3 | Arg (R) | 0 | G |
| A | Ile (I) | 61 | Thr (T) | 24 | Asn (N) | 57 | Ser (S) | 12 | U |
| | Ile (I) | 8 | Thr (T) | 4 | Asn (N) | 5 | Ser (S) | 0 | C |
| | Ile (I) | 21 | Thr (T) | 11 | Lys (K) | 86 | Arg (R) | 13 | A |
| | Met (M) | 21 | Thr (T) | 1 | Lys (K) | 6 | Arg(R) | 0 | G |
| G | Val (V) | 24 | Ala (A) | 30 | Asp (D) | 50 | Gly (G) | 24 | U |
| | Val (V) | 4 | Ala (A) | 1 | Asp (D) | 0 | Gly (G) | 3 | C |
| | Val (V) | 22 | Ala (A) | 9 | Glu (E) | 47 | Gly (G) | 17 | A |
| | Val (V) | 4 | Ala (A) | 0 | Glu (E) | 3 | Gly (G) | 4 | G |

^a TER, termination codon^b opal codon

表三、花生簇葉病病原菌質體 *gyrB* 基因之胺基酸序列與多種細菌之 *gyrB* 基因與 *parE* 基因之胺基酸序列相似度分析

Table 3. The percentage of identity of PNWB-phytoplasma putative GyrB protein compared with the GyrB proteins and ParE proteins of various organisms

| Organisms | Percentage of identity of | |
|-------------------------------|---------------------------------------------|-----------------|
| | PNWB-phytoplasma putative GyrB protein with | |
| | GyrB protein of | ParE protein of |
| <i>Mycoplasma genitalium</i> | 49 % | 41 % |
| <i>Mycoplasma pneumoniae</i> | 48 % | 44 % |
| <i>Mycoplasma hominis</i> | 49 % | 42 % |
| <i>Mycoplasma arthritidis</i> | 47 % | 40 % |
| <i>Bacillus</i> sp. | 54 % | 44 % |
| <i>Escherichia coli</i> | 37 % | 34 % |

表四、花生簇葉病病原菌質體 *gyrA* 基因之胺基酸序列與多種細菌之 *gyrA* 基因與 *parC* 基因之胺基酸序列相似度分析

Table 4. The percentage of identity of PNWB-phytoplasma putative GyrA protein compared with the GyrA proteins and ParC proteins of various organisms

| Organism | Percentage of identity of | |
|---------------------------------|---------------------------------------------|-----------------|
| | PNWB-phytoplasma putative GyrA protein with | |
| | GyrA protein of | ParC protein of |
| <i>Mycoplasma genitalium</i> | 40 % | 26 % |
| <i>Bacillus</i> sp. | 42 % | 32 % |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 41 % | 30 % |
| <i>Escherichia coli</i> | 36 % | 22 % |