

长春花黄化植原体核糖体蛋白基因片段序列分析*

蔡 红 陈 惠 李 凡 陈海如**

(云南农业大学云南省植物病理重点实验室 昆明 650201)

摘要: 对自然表现典型黄化症的长春花植株总 DNA 进行植原体核糖体蛋白基因 (ribosomal protein gene, *rp* gene) PCR 扩增, 得到约 1.3kb 的特异片段。将此特异片段与 pGEM-T Easy 载体连接并转化到大肠杆菌 JM109 感受态细胞中, 通过 PCR 鉴定、限制性内切酶 (*Eco*RI) 酶切分析、核苷酸序列测定及分析, 结果表明该株系核糖体蛋白基因片段长 1,244 bp, 包含 *rp*122、*rps*3 基因, 分别编码 129 和 252 个氨基酸, 且这两个基因为重叠基因。该植原体核糖体蛋白基因特性与其它植原体相似。

关键词: 长春花, 黄化, 植原体, 核糖体蛋白基因, 序列分析

中图分类号: S436.66 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 01-0034-04

SEQUENCES ANALYSIS OF RIBOSOMAL PROTEIN GENE OF PHYTOPLASMA ASSOCIATED WITH PERIWINKLE YELLOWS

CAI Hong CHEN Hui LI Fan CHEN Hai-Ru

(The Key Laboratory for Plant Pathology of Yunnan province, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201)

Abstract: A 1.3kb DNA fragment was amplified in DNA samples extracted from periwinkle showed yellows. The amplified fragment was ligated into pGEM-T easy vector and then transformed into JM109 strain of *E. coli*. Cloned DNA fragments were verified by PCR, restriction endonuclease (*Eco*RI) digestion and sequence analysis. The result revealed that the ribosomal protein gene of PY strain consists of 1244 base pairs, which contains the entire *rp*122 gene encoding 129 amino acids and *rps*3 gene encoding 252 amino acids. These two genes are overlap. The character of ribosomal protein gene of PY strain is very resemble with that of other phytoplasmas.

Key words: Periwinkle, Yellows, Phytoplasma, Ribosomal protein gene, Sequence analysis

植原体 (phytoplasma) (原称类菌原体 Mycoplasma-like Organism, 简称 MLO) 是一类无细胞壁, 不能人工培养的, 存在于植物筛管细胞中的类似植物病原细菌的原核生物。迄今为止, 世界上报道的植物植原体病害多达 300 余种, 其主要症状包括丛枝、黄化、花变叶、花器退化等。

长春花 (*Catharanthus roseus*) 为夹竹桃科园艺观赏草本植物, 目前研究报道的自然侵染长春花的植原体株系有长春花小叶 (Periwinkle little leaf, CN1)^[1], 美洲翠菊黄化 (American aster yellows, AAY)^[2], 长春花褪绿 (Periwinkle virescence, VR BLTVA)^[3] 及墨西哥长春花褪绿 (Mexican periwinkle virescence, MPV)^[4] 等, 这些株系在目前的植原体分类体系中分别属于不同的 16Sr 组或亚组^[5]。而核糖体蛋白基因与 16S rRNA 基因一样, 也是反映植原体等原核生物本质特征的基因, 常用于植原体等相关原核生物的分类研究。

本研究采用分子生物学方法对自然表现黄化症的长春花植株进行植原体核糖体蛋白基因片段扩增, 并对扩增片段进行克隆、序列测定及分析, 为进一步确定该植原体

* 云南省自然科学基金 (No. 2000C0014Q)

云南省省院省校科技合作基金资助项目 (No. 98YQ009)

** 联系人

收稿日期: 2001-12-25, 修回日期: 2002-03-08

株系的分类提供一定的理论依据。现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

自然显症的长春花 (*Catharanthus roseus*) 采自云南农业大学校园内。质粒 pGEM-T Easy Vector、Wizard® PCR Preps DNA Purification System 纯化试剂盒为 Promega 公司产品; 泡桐丛枝病阳性对照、*E. coli* JM109 菌株为本室保存。限制性内切酶及其它酶类均为 TaKaRa 公司产品。

1.2 植株总 DNA 提取

以泡桐丛枝病为阳性对照。总 DNA 提取方法参照 Ahrens 和 Seemüller^[6] 的方法进行, 最后于 -20℃ 冰箱中保存备用。

1.3 引物设计与合成

根据 Lim & Sears^[7] 报道的引物对 rpF1/R1 序列合成引物 (上海 Sangon 公司合成), 引物序列如下:

rpF1: 5'-GGACATAAGTTAGGTGAATTT-3'

rpR1: 5'-ACCATATTTAGTCTTTTTTGG-3'

1.4 PCR 扩增

反应液为 50μL, 含有 1×PCR Buffer, 200μmol/L dNTP, 2.0mmol/L Mg²⁺, 0.6μmol/L 引物对, 2.5U Taq 酶, 50ng 模板 DNA, 30μL 矿物油。反应循环为 95℃ 预处理 5 min, 95℃ 30s, 57℃ 1min, 72℃ 90s, 共 35 个循环, 最后于 72℃ 保温 10 min。取 10μL PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳, 经溴化乙锭染色后, 在紫外透射台上观察。

1.5 PCR 产物纯化及克隆

PCR 产物纯化采用 Wizard® PCR Preps DNA Purification System 纯化试剂盒进行。纯化后的 PCR 产物与 pGEM-T Easy Vector 于 16℃ 连接过夜。按 Cohen^[8] 等的氯化钙法制备感受态细胞。将连接产物加到 200μL *E. coli* JM109 感受态细胞中, 冰浴 30min, 42℃ 水浴热击 90s, 冰浴 2min, 加入 700μL LB 液体培养基, 37℃, 220r/min, 轻摇 30~40min, 菌液 3,000 r/min, 离心 5min, 留沉淀及少量上清, 混匀, 涂布于含 50mg/mL Amp 的 X-gal 筛选平板上, 倒置培养皿于 37℃ 培养 12~16h。

1.6 重组子筛选

挑选筛选平板上的白色菌落, 采用碱裂解法提取少量重组质粒 DNA, 经 PCR 及酶切鉴定, 筛选出含有外源片段的重组克隆。

1.7 核苷酸序列测定及分析

经筛选鉴定后的重组质粒送大连 TaKaRa 公司进行序列测定, 并通过软件 (DNAMAN, Version 4.0) 进行核酸及其所含基因的氨基酸序列分析。

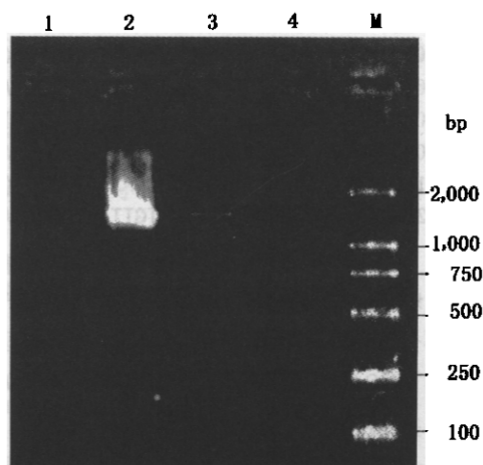


图 1 PCR 扩增结果

1 双蒸水对照, 2 泡桐丛枝病植株总 DNA, 3 长春花黄化植株总 DNA, 4 健康长春花植株, M DNA marker

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

长春花黄化症植株总 DNA 核糖体蛋白基因 PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖电泳, EB 染色后, 结果见图 1。扩增片段约 1.3 kb, 与引物设计相符。以泡桐丛枝病为阳性对照的扩增中也出现相同的特异条带, 以双蒸水及健康长春花总 DNA 为阴性对照的扩增中却没有出现特异条带, 表明长春花植株中存在植原体, 将此植原体株系暂命名为长春花黄化植原体 (Periwinkle yellows, PY)。

2.2 重组子 PCR 及酶切鉴定结果

重组质粒 DNA 经 PCR 扩增及 *Eco*RI 酶切, 均得到约 1.3kb 的特异片段, 与从植株总 DNA 中扩增到的片段大小相同, 说明重组子含有 PCR 产物目标外源片段。

2.3 序列测定及分析

对含有目标外源片段的重组质粒进行序列测定, 表明长春花黄化植原体核糖体蛋白基因片段长 1,244nt (Genbank 登录号为 AF453327)。DNAMAN 软件分析表明该序列包

1	GGACATAAGTTAGGTGAATTTTCCCTACACGTACTTACCGGGACACAACAAAAAGAC	rps19
61	AAAAAATGCAAAAAAATAAATAATGGGAAGGAATAACTATGAAAACTAAAAACGCCA	
121	AAGCGATTACTAGAAAAGTTTCAATCGCCCTCGAAAAGCAGCTTTAGTTGTTGATTAA	
181	TTCGAGGAAAAATATTGCACAAGCTCAAGCCATTTTAACTTTTACCCTAAAGTAGCTG	rp122
241	CTCCGTTATTTTAAACCTTTTAAACAGTGCTGTTTCCAATGCTGTTAATAATTTAAAT	
301	TAAACCGCGAACAACTTTATGTTAAAGAAGTTTTGTCAACGAAGGTTTGCCTTTAAAC	
361	GTATGTTTCCAAGAGCTAAAGGTTCTGGTGATATGATTAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG	
421	CTTTAGTAATAACTTCTAGCACCACAACTTGCAAACATCAAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG	
481	GGTCAAAAACTAATCCTAACCGCTTAAGATTAGGCATTATTAGAACTTGGGAATCTCAA	
541	TGGTGTGTTAATGATAAAGAAATTCCTAATTTAATTAAGAAGATTTTTAATTCGTAA	
601	CTAATCAATAATTTTACTAAAAAAGTGCTATCAGTCAAATTGACATTGAACGCCTAAAA	
661	GAAAAAATAAAAAACCGTATCACTATTTCTGTCCACACCGCTAAACGAGGCGTTATTATT	
721	GGAAAGATGGCGATACACGCAACAAATTAGTTGCCAACTCAAAGAACTTACCCAAAAA	rp3
781	GACGTTAATCTTAACGTGTTAGAAGTTAAAACTCTGATAAAAAACGCTTTATTAATTGCT	
841	CAAAATATGGCTGAACAACTAGAAAAATCGTATGTTTTCCGCGGTGTTCAAAAAATGGCA	
901	ATCCAAAAAGCCCTAAAAGCTGGTGCCAAAGGAGTAAAACTTTAATTTCTGGTCGTTTG	
961	GGTGGTGCTGAAATAGCTCGTAGCGAAGGACATGCCGAAGGCAGAGTTCTCTACACACT	
1021	CTAAGAGCAGACATCGATTACGCTGCTGTTGAAGCTCACACTACTTATGGAGTTTATGGA	
1081	ATTAAAGTATGGATTTTCCACGGTGAAGTTTACCAGGACAAACCATTTTAGACACTAGA	
1141	AAACCGTTTGCTTCCCAATCTTCTAACACTCCTAACAGACGCCCTCGCAATTTCAAAGGA	
1201	GGCAACAATAATCATGTTAATGCCAAAAAGAACTAAATATCGTA	

图 2 PY 株系核糖体蛋白基因部分核苷酸序列

下划线和阴影分别表示终止密码子和起始密码子, *rp122* 和 *rp3* 表示核糖体蛋白基因包含的两个开放阅读框括部分 *rps19* 基因和全部 *rp122* 和 *rp3* 基因, 其中 *rp122* 基因使用柔膜菌纲原核生物标准的 AUG 作为起始密码子, 共编码 129 个氨基酸, *rp3* 基因却使用 GUG 作为起始密码子, 共编码 252 个氨基酸, 且 *rp122* 和 *rp3* 基因为重叠基因, 在所含的 3 个基因中均以 UAA 作为终止密码子, 这些特性均与其它植原体核糖体蛋白基因序列相似^[7,9] (图 2, 图 3)。核酸序列及所含 *rp122* 和 *rp3* 基因编码的氨基酸序列与已在 GenBank 中登录的 16S rI 组中的植原体株系同源率均达到 97.0%, 而与其它 16Sr 组的同源率却低于 80%。分别比较 *rp122* 和 *rp3* 基因编码的氨基酸序列, PY 株系与 Jomantiene 等^[10] 从草莓植株

中检测到的 STRAWB 2 株系 (16S rI 组) 仅存在 3 个和 6 个氨基酸差异 (图 4, 图 5)。

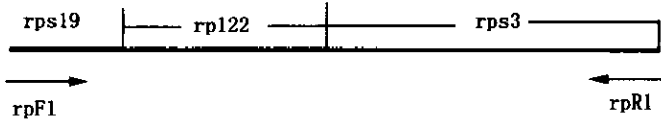


图 3 引物 rpF1/R1 扩增片段所包含的基因的位置

PY	METKNAKAITRKVSIAPRKARLVVDLIRGKNIAQAQAILTFTPKVAAPVILKLLNSAVSN
STRAWB2	METKNAKAIARKVSIAPRKARLVVDLIRGKNIAQAQAILTFTPKVAAPVILKLLNSAISN
PY	AVNNLKLNRQQLYVKEVFNVEGLRLKRMFPRAKSGSGMIKKRTSHITLVITSSTTNLQTS
STRAWB2	AVNNLKLNRQQLYVKEVFNVEGLRLKRMFPRAKSGSGMIKKRTSHITLVITSS-TNLQTS
PY	KEEEQSGSKN
STRAWB2	KEEEQSGSKN

图 4 PY 株系与 STRAWB2 株系 *rp122* 基因的氨基酸序列比较

PY	VGQKTNPNGLRLGLIIRTWESQWCNDKEIPNLIKEDFLIRKLINNETKKSASISQIDIERL
STRAWB2	MGQKTNPNGLRLGLIIRTWESQWYVNDKEIPNLIKEDFLIRKLINNFAKKSASISQIDIERL
PY	KEKNKNRITISVHTAKPGVVIIGKDGDTRNKLVAKLKELTQKDVNLNVLEVKNSDKNALLI
STRAWB2	KEKNKNRITI FVHTAKPGVVIIGKDGDTRNKLVVKLKELTQKEVNLNVLEVKNSDKTALLI
PY	AQNMAEQLENRMFFRRVQKMAIQKALKAGAKGVKTLISGRLGGAELARSEGHAEGRVPLH
STRAWB2	AQNMAEQLENRMFFRRVQKMAIQKALKAGAKGVKTLISGRLGGAELARSEGHAEGRVPLH
PY	TLRADIDYAAVEAHTTYGVLGIVWIFHGEVLPQGTLIDTRKPFASQSSNTPNRRPRNFK
STRAWB2	TLRADIDYAAVEAHTTYGVLGIVWIFHGEVLPQGTLIDTRKPFASQSSNTPNRRPRNFK
PY	GGNNNHVNAKKN
STRAWB2	GGNNNHVNAKKN

图 5 PY 株系与 STRAWB2 株系 *rps3* 基因的氨基酸序列比较

3 讨论

由于植原体可通过具有迁飞性的韧皮部饲食的昆虫，如叶蝉、飞虱等介体进行传播，所以在自然条件下，长春花很可能感染不同种类的植原体株系^[1-5]。随着植原体的不断深入研究，核糖体蛋白基因也作为植原体分类及系统发育研究的一个可靠标记。本实验通过对自然表现黄化症的长春花植株进行植原体核糖体蛋白基因 PCR 扩增，并对扩增产物进行克隆、序列测定及分析，为进一步确定该植原体株系的分类地位提供一定的依据，同时也为植原体核糖体蛋白基因序列库提供了一参考数据。

致谢 本文在实验过程中曾得到中国农业大学 2000 级分子植物病理专业谢勇博士的帮助和支持，在此表示感谢。

参考文献

[1] Davis R E, Lee I-M, Douglas S M, *et al.* *Phytopathology*, 1990, **80**: 789 ~ 793.

[2] Seemüller E, Schneider B, Maurer R, *et al.* *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1994, **44**: 440 ~ 446.

[3] Shaw M E, Kirkpatrick B C, Golino D A. *Phytopathology*, 1991, **81**: 1210.

[4] Gundersen D E, Lee I-M, Chang C J, *et al.* *Phytopathology*, 1994, **84**: 1128.

[5] Lee I-M, Gundersen-Rindal D E, Davis R E, *et al.* *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1998, **48**: 1153 ~ 1169.

[6] Ahrens U, Seemüller E. *Phytopathology*, 1992, **82**: 828 ~ 832.

[7] LIM P O, Sears B B. *Journal of Bacteriology*, 1992, **174**: 2606 ~ 2611.

[8] Cohen S N, Chang A C Y, Hsu L. *Proc Natl Acad Sci*, 1972, **69**: 2110.

[9] Su C J, Baseman J B. *Journal of Bacteriology*, 1990, **172**: 4705 ~ 4707.

[10] Jomantiene R, Davis R E, Maas J, *et al.* *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1998, **48** (1), 269 ~ 277.