

花生簇葉病菌質體 *rpsT*, *serS* 與 *hflB* 基因之選殖與分析

呂沛穎¹ 林長平^{1,2}

¹ 臺北市 國立臺灣大學植物病理與微生物學系

² 聯絡作者，電子郵件：cplin@ntu.edu.tw；傳真：+886-2-2366-1980

接受日期：中華民國 98 年 4 月 21 日

摘要

呂沛穎、林長平. 2009. 花生簇葉病菌質體 *rpsT*, *serS* 與 *hflB* 基因之選殖與分析. 植病會刊 18: 57-66.

本研究以建構與篩選不同花生簇葉病菌質體次基因體基因庫 (subgenomic library) 之策略，針對其 *serS* 基因進行選殖與分析。利用本研究室先前獲得之部分花生簇葉病菌質體 *serS* 基因序列，以 PCR 製備探針並應用於由花生簇葉病菌質體次基因體基因庫之篩選，獲得一選殖株 SI419，進一步以其選殖片段序列，利用 PCR 製備另一探針並用於另一次基因體基因庫之篩選，並獲得選殖株 HIII236。經序列整合分析，得知二選殖株之選殖片段中包含有兩個完整之 open reading frames (ORFs)，與兩個不完整之可能 ORFs，由 5' 端至 3' 端之順序分別將其命名為 ORF1 至 ORF4。其中 ORF1 為不完整之 ORF 但其序列與 *rpsT* 基因具有相似性，為獲得完整之 *rpsT* 基因，即由植物菌質體 *rpsT* 之保守性區域設計簡併性引子 (degenerate primer)，藉由 PCR 進行 *rpsT* 基因之選殖，並獲得選殖株 CW67。將各選殖株嵌入片段之重疊序列接續，遂獲得一 3,902 bp 花生簇葉病菌質體基因體之片段序列，其組成為 *rpsT-serS-hflB* 及一不完整之 ORF4。*rpsT* 基因之轉譯產物為 30S subunit ribosomal protein S20；*serS* 基因轉譯產物為絲胺基化 tRNA 合成酵素，兩者都參與於轉譯中，為蛋白質生合成之相關基因；*hflB* 基因其轉譯產物為 ATP-dependent Zn metalloendoprotease，具有分解多種蛋白質之能力。在 RT-PCR 試驗中，利用引子序列位於基因內部且其增幅片段橫跨 *rpsT-serS* 與 *serS-hflB* 基因間區域 (intergenic region) 之各引子對組合進行反應時，皆可獲得增幅產物，顯示三基因均有 RNA 表現，且可能位於同一多基因操縱組 (polycistronic operon) 內。

關鍵詞：花生簇葉病菌質體、次基因體基因庫、*rpsT* 基因、*serS* 基因、*hflB* 基因

緒言

植物菌質體 (phytoplasma) 原名似菌質體 (mycoplasmas-like organism, MLO)，最早於 1967 年發現，是一種重要的植物病原細菌；透過 16S rRNA 之核酸序列資料進行分群，現今共區分為 28 群，以及接近 100 個亞群⁽²¹⁾。直至目前全球已知有超過一千種的植物病害是與植物菌質體有關⁽¹⁾，其中包括桃、梨等重要果樹及花生、甘藷與泡桐等重要經濟作物的病害，在農業上已造成十分可觀的損失。花生簇葉病 (peanut witches' broom, PnWB) 屬於豆類簇葉病 (legume

witches' broom) 之一，在台灣花生簇葉病首先於澎湖及苗栗兩地被發現，此病原經由 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 螢光染色、電子顯微鏡之檢定，以及利用菟絲子 (dodder) 與南斑葉蟬 (*Orosius orientalis*, Matsumura) 等確定其傳播方式後，證實是由植物菌質體所引起之病害⁽²⁴⁾。台灣地區的花生栽培長期以來受到此病害之危害，對本省花生產業的發展影響很大。近年來，由於分子生物學相關研究技術發展迅速，因而許多研究室企圖藉由對植物菌質體之去氧核糖核酸 (DNA) 序列及基因表現調控機制之研究分析，以期能

對此一尚無法純培養之病原生物有進一步的瞭解。

多數生物體皆依循中心法則 (central dogma) 展現其生命現象，透過轉錄 (transcription) 將攜帶於 DNA 上之遺傳訊息轉換成 mRNA (核糖核酸)，並進一步透過轉譯 (translation) 將 RNA 上之訊息轉換成蛋白質，而參與到細胞活動之各反應中。在轉譯過程中，作為核酸階段進入蛋白質階段之橋樑者即為胺醯基化 tRNA 合成酵素 (aminoacyl-tRNA synthetase, aaRS)⁽⁴⁾，其中負責辨識絲胺酸進行醯化反應 (acylation)，生成 tRNA^{ser} 以供蛋白質生合成之酵素即為絲胺基化 tRNA 合成酵素，其係由 *serS* 基因轉譯而成。絲胺基化 tRNA 合成酵素在系統發生學上保存了兩種演化型，且此兩種演化型各透過不同之機制辨識其基質，為胺醯基化 tRNA 合成酵素中唯一具有此特性者^(2,5)。

本研究透過基因選殖技術，建構並篩選不同之花生簇葉病菌質體次基因體基因庫，除選殖獲得 *serS* 基因外，亦同時獲得其上游之 *rpsT* 基因與下游之 *hflB* 基因，其中 *rpsT* 基因之轉譯產物為核糖體之小次單元 30S subunit 中之核糖體蛋白質 S20^(11,17)，而 *hflB* 基因之轉譯產物則為 ATP-dependent Zn metalloendoprotease，主要功能為進行多種蛋白質之分解^(18,19)。在此亦針對花生簇葉病菌質體 *serS* 基因、*rpsT* 基因與 *hflB* 基因之表現方式及其核酸與胺基酸序列與其他細菌間之差異進行探討分析，以期能對植物菌質體在蛋白質的生合成與該基因在演化上和其他物種的親緣關係有更深一層之理解。

材料與方法

試驗植物之繁殖與全 DNA (total DNA) 及全 RNA (total RNA) 之純化

本實驗以日日春 (*Catharanthus roseus*, periwinkle) 作為試驗植物以繁殖植物菌質體。病原菌之繁殖，乃利用側嫁接法 (side graft) 將植物菌質體傳至健康日日春中，植物全 DNA 抽取之方法主要乃參考 Ko 與 Lin 等人的方法⁽¹²⁾ 稍作修改後進行；全 RNA 之抽取法則利用 Verwoerd 等人之方法⁽²³⁾ 進行。

花生簇葉病菌質體 *serS* 基因篩選用核酸探針 (probe) 之製備

利用本研究室先前對花生簇葉病菌質體之研究中所獲得之轉型株 clone 22⁽²²⁾，將其定序分析後獲得部份花生簇葉病菌質體之 *serS* 基因序列，並由 NCBI (National Center for Biotechnology Information,

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 基因資料庫中收集之洋蔥黃化病菌質體 OY-M (BAD04168)、翠菊黃化簇葉病菌質體 (ABC65749)、*Mycoplasma genitalium* (AAC71221) 與 *M. pneumoniae* (AAB95797) 等生物之 *serS* 基因之胺基酸序列 (括號內為 GenBank 登錄號碼)，將此五筆序列以 CLUSTAL 軟體進行比對，尋找該基因上之保守性區域，據以設計出 PCR 之引子對 *wsf2/wsr1* (引子序列與位置詳見表一及圖一)。PCR 反應中以 50 ng 之罹病或健康日日春植株全 DNA 作為模板，進行 35 個循環，反應條件如下：94°C 30 秒；50.5°C 30 秒；72°C 45 秒。反應完成後，將反應產物於 1% 瓊脂凝膠進行水平電泳分析，後透過 QIAquick[®] PCR purification kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) 與 TOPO TA cloning[®] Kit (Invitrogen Corporation, Eugene, Oregon) 進行 PCR 產物之純化與選殖。獲得之選殖株重組質體嵌入片段 (即選殖片段) 之定序工作委由明欣生物科技有限公司 (Misson Biotech, Taipei, Taiwan) 進行，以確定選殖片段即為 *serS* 基因之部分序列。

核酸探針之標識係採用 PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) 進行，反應模版即為上述步驟中獲得選殖株之選殖片段，並以前述之引子對 *wsf2/wsr1* 進行 PCR 非放射標識反應，獲得篩選 *serS* 基因之核酸探針 WS2-5，以進行南方氏雜配及基因庫之篩選。

花生簇葉病菌質體次基因體基因庫 (subgenomic library) 之構築與 *serS* 基因之選殖

先以南方氏雜配確立建構次基因體基因庫時適用之限制酵素與待選殖片段之大小。實驗方法乃參考 Ko 與 Lin 等人的方法⁽¹²⁾ 進行，結果顯示在限制酵素 *SpeI* 酵解之罹病日日春植株全 DNA 有單一大約 3.5 kb 之雜配訊號 (詳見結果)，故據以選擇 *SpeI* 酵解之大小約為 3.5 kb 之電泳片段進行基因庫之構築。在此先取 10 μg 之罹病日日春 DNA 以 20 U 之 *SpeI* 限制酵素 (Roche Molecular Biochemicals) 於 37°C 下作用 16 小時後，以 65°C 處理 10 分鐘以終止反應，再以 0.8% 瓊脂凝膠進行水平電泳，切下 3.5 kb 大小之酵解產物以 QIAquick[®] gel extraction kit (QIAGEN GmbH) 進行純化，此即為待選殖片段，並選用 pBluescriptII SK (-) phagemid (Stratagene, LA Jolla, CA) 為載體，經 *SpeI* 酵解後進行 CIAP (Promega Corporation, Madison, Wisconsin) 處理將 plasmid DNA 的 5' 去磷酸化，隨後將兩者依莫耳數比分別為 1:1, 1:3 及 3:1 之比例混合，加入 20 單位之 T4 DNA ligase (New England BioLabs, Ipswich, England)，於 16°C 水浴中作用 16 小時進行黏

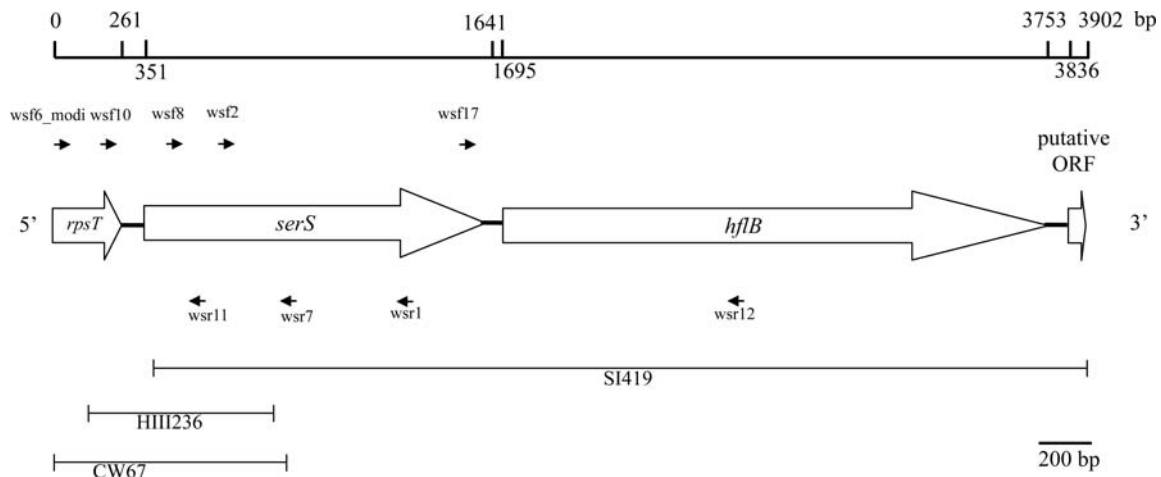
表一、本研究所使用引子之核酸序列

Table 1. Sequences of oligonucleotide primers used in this study

Primer	Sequence (5' to 3') ¹	Size (mer)	Annealing site ²	Source	Purpose
wsf2	GTC GAC GGT ATA AAT TGA AGA ACA	24	nts 615-638	this study	probe WS2-5
wsr1	TAA CAA CAT AAT CCG ATA AGG TAA	24	nts 1300-1323	this study	probe WS2-5
wsf8	ATG AAG ATT TAT TGG ATG AAT T	22	nts 422-443	this study	probe WS8-6
wsr7	ACG GGC CCC TAA TCC TT	17	nts 854-870	this study	probe WS8-6
wsf6_modi	ATG GCW AAT ATT AAR CAR CAA A	22	nts 1-22	this study	clone CW67
wsf10	AGA AAG AAA AGA AAT GCT GCT AT	23	nts 211-233	this study	RT-PCR
wsr11	TTT GGC GAG AAA ACT GAT T	19	nts 508-526	this study	RT-PCR
wsf17	TAC AGG AAT ATT TGG GAA CAG	21	nts 1595-1615	this study	RT-PCR
wsr12	CCT TTA GGA ATA CGA GCG CC	20	nts 2539-2378	this study	RT-PCR

¹ W = A or T; R = A or G.

² The annealing site of PCR primers on the 3914 bp genomic fragment of peanut witches'-broom phytoplasma cloned and sequenced in this study (GenBank FJ611944).



圖一、本研究所使用之各 PCR 引子對及獲得之花生簇葉病菌質體三選殖株 SI419, HIII236 與 CW67 之選殖片段序列與以軟體續接獲得之 3902 bp 花生簇葉病菌質體基因體片段間之相對位置示意圖。

Fig. 1. Schematic illustration showing the relative position of the cloned fragments in clones (SI419, HIII236 and CW67) obtained in this study in the 3902 bp PnWB phytoplasma genomic fragment conducted by SeqMan sequence analysis program. Large arrows refer to the direction of transcription, and small arrows refer to the annealing sites and the directions of oligonucleotide primers used in this study. The upper solid line indicates the relative nucleotide positions.

結反應，隨後以 HITTM RH617 (Real Biotech Corporation, RBC, Taipei, Taiwan) 作為勝任細胞，進行轉形作用以獲得轉形株。

以菌落雜配反應 (colony hybridization) 篩選轉形株，首先將尼龍濾膜 (HybondTM-N+, Amersham Pharmacia Biotech, Sweden) 貼於接種有轉形株並於 37°C 培養 16 小時之轉形株菌盤上，在室溫中靜置 1 分鐘使濾膜吸附菌體。濾膜取出後，菌體面向上依序置於各別以 10% SDS solution、denaturation solution (0.5 N NaOH, 1.5M NaCl)、neutralization solution (0.5 M

Tris-base, 1.5 M NaCl, pH 7.5) 與 2x SSC 浸潤之 3MM 濾紙上，除於 10% SDS solution 時為 3 分鐘外，其餘各 5 分鐘，以 $1.2 \times 10^5 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ 強度的 UV 光照射濾膜約 30 秒使 DNA 與尼龍濾膜聯結，其後將濾膜浸至 2x SSC 中去除殘餘菌體後，風乾 30 分鐘，以進行後續之雜配與呈色反應，步驟同南方氏雜配反應，其探針亦為 WS2-5。篩選獲得選殖株之定序與前述核酸探針製備時所採用之選殖與定序方法相同，其結果以 Lasergene 軟體 (DNASTAR Inc., Madison, WI) 做進一步分析，尋找可能之 ORF。

花生簇葉病菌質體 *serS* 基因 5' 端與 5' 端上游未轉譯區 (5'-UTR) 篩選用核酸探針之製備與 *serS* 基因 5' 端及 5'-UTR 之選殖

由於在前人研究中顯示，*serS* 基因 5' 端未轉譯區中可能具有調控此基因之功能⁽⁷⁾，為進一步選殖出完整之 *serS* 基因與了解其基因表現，遂利用前述實驗獲得選殖株中新獲取之 *serS* 基因之前端序列，設計 PCR 引子對 wsf8/ wsr7 (引子序列與位置詳見表一及圖一) 進行 PCR 反應，反應條件如下：94°C 30 秒；51°C 30 秒；72°C 30 秒，PCR 產物之純化、選殖、定序與非放射標識反應如前述，即可獲得南方氏雜配及基因庫篩選用探針 WS8-6。依南方氏雜配反應之結果 (詳見結果)，選取 *HindIII* 限制酵素 (Roche Molecular Biochemicals) 並選擇 700 至 750 bp 大小之酵解片段進行次基因體基因庫之構築。基因庫構築完成後之篩選及獲得選殖株之定序及分析方法與 *serS* 基因篩選中使用之方法相同。

serS 上游基因 *rpsT* 之選殖與分析

藉由分析已完成全基因體定序之洋蔥黃化病菌質體 OY-M、翠菊黃化簇葉病菌質體、*Ca. Phytoplasma australiense* 與 *Ca. Phytoplasma mali* 等四種植物菌質體之 *rpsT* 基因序列，並於 *rpsT* 基因轉錄起始點附近之高保守性區域，設計簡併性引子 (degenerate primer) wsf6_modi 作為正向引子 (forward primer)，並以前述之 wsr7 為反向引子 (reverse primer) (引子序列與位置詳見表一及圖一)，以進行 PCR 反應，反應條件如下：94°C 30 秒；52°C 30 秒；72°C 50 秒。PCR 產物之純化、選殖、定序與分析方法如前述。

rpsT, *serS* 與 *hflB* 基因之推衍蛋白質之結構分析

將由各 ORF 序列推衍出之胺基酸序列登錄至 Swiss Model 網頁 (<http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>)，以同源性類比法進行蛋白質結構之預測⁽³⁾。

serS 與 *hflB* 基因之轉錄起始點分析

本實驗即以 RT-PCR 方法，依據有無 RNA/ cDNA hybrid 之合成及其後續 PCR 產物之生成，以驗證各基因有無 RNA 表現並確定各基因可能之轉錄起始點。取 20 μ g 罹病或健康前述之日日春植株全 RNA 加入 10 單位之 RQ1 RNase-free DNase (Promega Corporation) 依廠商建議之方法進行微量 DNA 之去除，並以 Plant Total RNA Miniprep Purification Kit (Hopegen Biotechnology Development Enterprise, Taipei, Taiwan) 再次純化

RNA。取上述處理後之 5 μ g 罹病或健康之日日春植株全 RNA 依序加入 4.5 μ l 的 2.5 μ M dNTP、100 μ M 反向引子 (wsr7, wsr11, wsr12; 序列與位置見表一及圖一) 1 μ l，其反應條件如下：65°C 5 分鐘；4°C 5 分鐘。再依序加入 1 μ l 0.1M DTT，4 μ l 5x First-Strand buffer，反轉錄酵素 SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogene Corporation) 2 μ l (200 U/ μ l)，進行反轉錄作用，反應條件如下：55°C 1 小時，70°C 15 分鐘 (wsr11 為 50°C 1 小時，70°C 15 分鐘)。取 250ng 之 RNA/ cDNA hybrid 作為模版，另分別取罹病或健康之日日春植株全 RNA 250 ng 以及全 DNA 50ng 作為模版以為對照。針對各模板分別以引子對 wsf10/ wsr7, wsf10/ wsr11 與 wsf17/ wsr12，進行 PCR 反應，其反應條件與各 PCR 反應中所使用之 RNA/ cDNA hybrid 來源均列於表二。

結 果

花生簇葉病菌質體 *serS* 基因與 5' 端上游未轉譯區之選殖

由南方氏雜配反應結果顯示用以基因篩選之核酸探針 WS2-5 與 WS8-6 皆可與罹病之日日春植株全 DNA 產生雜配訊號，在健康日日春之全 DNA 則無任何雜配訊號 (圖二)。依南方氏雜配反應之結果，分別以限制酵素 *SpeI* 與 *HindIII* 構築次基因體基因庫。在由限制酵素 *SpeI* 構築之次基因體基因庫之篩選中，獲得一選殖株 SI419 (圖一)，其選殖片段全長為 3548 bp，將選殖片段之核酸序列經 NCBI 進行 BLAST 初步比對，確定其為花生簇葉病菌質體之基因體片段。進一步以 DNASTAR 軟體分析，發現該選殖片段包含一個完整與兩個不完整之可能 ORF，其中第一個不完整之 ORF 即為 *serS* 基因，推估約缺少 5' 端 30 至 50 bp 大小之片段。故藉由在由限制酵素 *HindIII* 構築之次基因體基因庫之篩選中，獲得一選殖株 HIII236 (圖一)，其選殖片段全長為 693 bp，該選殖片段中包含兩個不完整之可能 ORF，兩者間相距 90 bp，第一個不完整之 ORF 推衍所得之胺基酸序列與菊黃化簇葉病菌質體及洋蔥黃化病菌質體之 *rpsT* 基因轉譯產物具高相同度。初步就兩選殖株之選殖片段序列進行整合，得知其中包含有兩個完整 ORFs 與兩個不完整之 ORFs，依其由 5' 端至 3' 端之順序分別將之命名為 ORF1 至 ORF4。對於各 ORF 之特性，將於後續之整合序列中作進一步之分析。

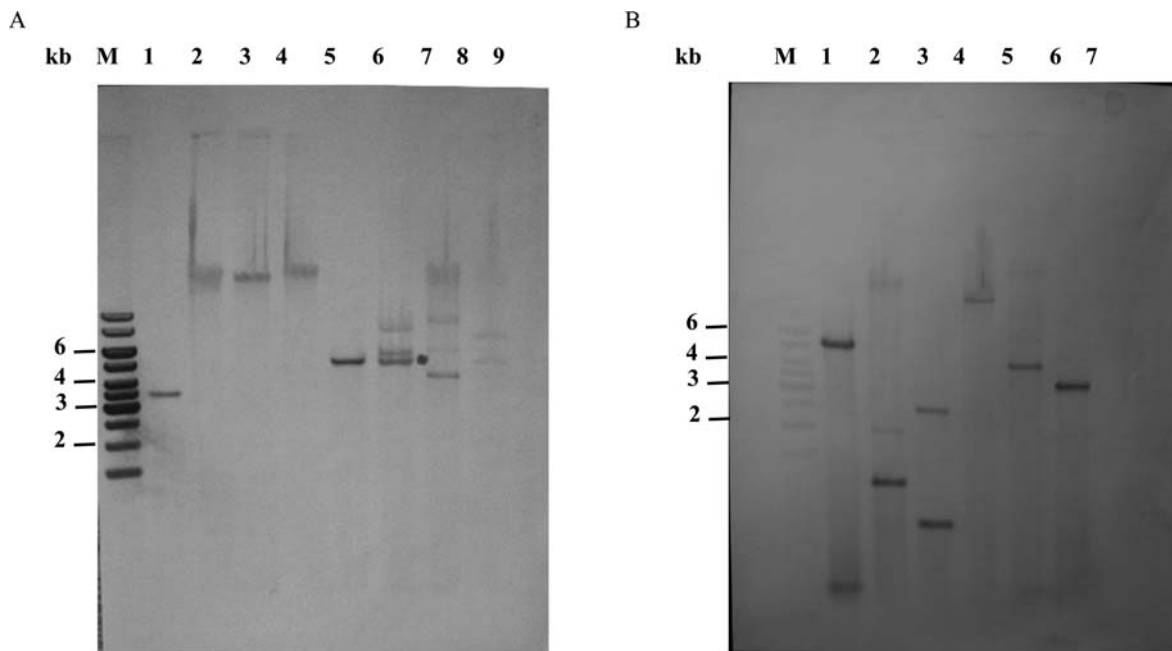
表二、本研究中所使用之各引子對在聚合酵素連鎖反應中之反應條件與預期產物大小

Table 2. The PCR thermocycling parameters used in this study for different PCR primer pairs

PCR parameter	Primer pairs		
	wsf10/ wsr7	wsf10/ wsr11	wsf17/ wsr12
Preheat ¹	94°C, 5 min	94°C, 5 min	94°C, 5 min
Denaturation	94°C, 30 sec	94°C, 30 sec	94°C, 30 sec
Annealing	54°C, 30 sec	51.5°C, 30 sec	60°C, 20 sec
Extension	72°C, 30 sec	72°C, 25 sec	72°C, 45 sec
Cycle No.	35	35	35
Final incubation	72°C, 7 min	72°C, 7 min	72°C, 7 min
Amplified length	660 bp	330 bp	784 bp
Source ²	wsr7	wsr11	wsr12

¹ PCR reaction tube was preheated before first cycle of PCR

² The reverse primers used in the synthesis of the first strand cDNAs



圖二、以核酸探針 WS2-5 (A) 及核酸探針 WS8-6 (B) 對以不同內限制酵素酵解後之受花生簇葉病感染之日日春與健康日日春植株全 DNA 進行南方氏雜配分析之結果。

Fig. 2. Southern blot analysis. A, Total DNA (5 μ g per lane) prepared from healthy periwinkle digested with restriction enzyme *ClaI* (lane 9) and from PnWB phytoplasma-infected periwinkle digested with restriction enzymes *SpeI* (lane 1), *SacII* (lane 2), *SacI* (lane 3), *SmaI* (lane 4), *EcoRV* (lane 5), *EcoRI* (lane 6), *XbaI* (lane 7), and *ClaI* (lane 8), respectively. B, Total DNA (5 μ g per lane) prepared from healthy periwinkle digested with restriction enzyme *SpeI* (lane 7) and from PnWB phytoplasma-infected periwinkle digested with restriction enzymes *EcoRV* (lane 1), *HincII* (lane 2), *HindIII* (lane 3), *kpnI* (lane 4), *XbaI* (lane 5), and *SpeI* (lane 6), respectively. Hybridization was conducted at 68°C using the PCR DIG-labeled probe WS2-5 (A) and probe WS8-6 (B). M, 1 kb DNA ladder as molecular weight standards (Fermentas Life Science). Sizes (in kb) of the electrophoresis and hybridization signals are shown on the left margins.

serS 上游基因 *rpsT* 之選殖

為進一步獲取 *rpsT* 基因之全長序列，以引子對 wsf6_modi/ wsr7 進行 PCR 反應之產物經純化與選殖後，獲得選殖株 CW67 (圖一)，其選殖片段全長為 870 bp，該選殖片段包含一個可能完整之 ORF 與一個不完

整之可能 ORF，經 NCBI 進行 BLAST 初步比對，確定可能完整之 ORF 即為花生簇葉病菌質體之 *rpsT* 基因序列，而另一 ORF 即為前述結果中已獲得之 *serS* 基因之部分序列。對於各 ORF 之特性，將於後續之整合序列中作進一步之分析。

各選殖株選殖片段之整合序列特性分析與蛋白質結構之預測

由於上述結果中之三選殖株選殖片段序列重疊部分之核酸序列相同度皆為 100%，故在此以 DNASTAR 軟體續接，即可得到一長 3902 bp 之花生簇葉病菌質體基因體片段，此一基因體片段之序列已登錄至 NCBI，登錄號碼為 GenBank FJ611944，各選殖株與基因體片段間之相對位置圖見圖一。在本序列中包含一個可能完整之 ORF1 即為 *rpsT* 基因 (nts 1-261)；其後為兩個完整之 ORF，分別為 *serS* 之 ORF2 (nts 352-1641) 及 *hflB* 之 ORF3 (nts 1696-3753)；最後則為一個不完整之 ORF 4 (nts 3837-3902)，其可能為未知功能之假設性蛋白 (hypothetical protein) 基因。

依照目前已完成基因體定序之植物菌質體之 *rpsT* 基因與本研究中獲得之花生簇葉病菌質體之 *rpsT* 基因比對結果，ORF1 可能即為一完整之 ORF，與其他四種植物菌質體在胺基酸序列上則有 47% 至 52% 之相同度 (identity)，而相似度 (similarity) 則皆為 60% 以上。若假設其為完整之 ORF 以進行分析，則此 *rpsT* 基因之全長共 261 bp，其核酸組成為 A: 44.06%，G: 14.56%，T: 32.95%，C: 8.43%，A+T 比值為 77.01%，G+C 比值為 22.99%，轉譯起始碼為 ATG，終止碼為 TAA，共可轉譯出 86 個胺基酸。其推衍蛋白質之結構預測結果也顯示其與 *Escherichia coli* 之核糖體蛋白質 S20 在構型上極為相似，皆為三個 helices 所組成之蛋白 (蛋白質結構預測圖在此未呈現)。

本研究中所選殖獲得之 *serS* 基因其全長為 1290 bp，將此 *serS* 基因與其他植物菌質體及革蘭氏陽性菌之 *serS* 基因進行比對，結果顯示在胺基酸序列上則有 39% 至 55% 之相同度及 58% 至 73% 之相似度。而各物種 *serS* 基因之轉譯產物絲胺基化 tRNA 合成酵素在 catalytic domain 中之高保守性結構序列 motif 1、motif 2 與 motif 3，也可在此花生簇葉病菌質體之 *serS* 基因之轉譯產物中發現。在推衍蛋白質之結構預測結果也顯示其與 *E. coli* 之絲胺基化 tRNA 合成酵素在構型上最為接近，其中 motif 1 位於該蛋白之第 180 個至第 200 個胺基酸間，motif 2 位於第 253 個至第 291 個胺基酸間，motif 3 則位於第 380 個至第 412 個胺基酸間，以及在第 26 個至 102 個胺基酸間亦形成之一長臂狀 antiparallel coiled-coil，均符合絲胺基化 tRNA 合成酵素 N-terminal domain 之主要構型 (蛋白質結構預測圖在此未呈現)，其核酸組成為 A: 38.53%，G: 15.27%，T: 35.50%，C: 10.70%，A+T 比值為 74.03%，G+C 比值為 25.97%，轉譯起始碼為 GTG，終止碼為 TAA，轉譯可得 429 個胺基酸。此外，在其起始密碼上游亦發現可

能之 -10 element 與 -35 element，但未發現可能之核糖體鍵結處。

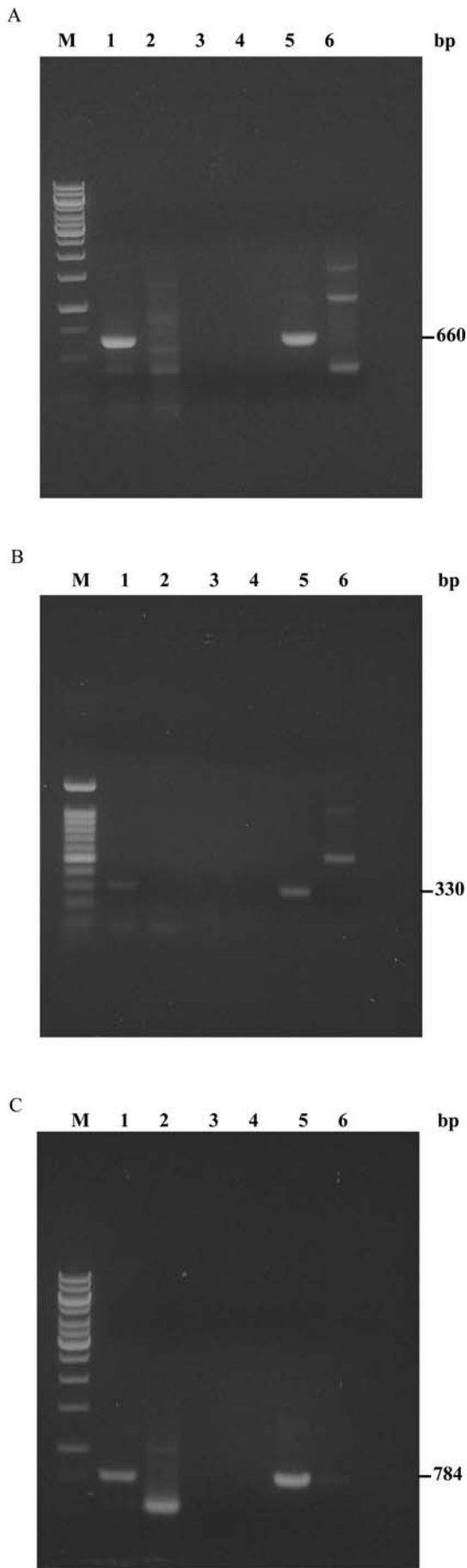
本研究中所選殖獲得之 *hflB* 基因全長為 2058 bp，將此一基因與其他植物菌質體及 *Acholeplasma laidlawii* 之 *hflB* 基因進行比對，顯示在胺基酸序列上之相同度則為 36% 至 41%，而相似度則為 52% 至 60%。在各物種 *hflB* 基因轉譯蛋白中之二保守功能性區塊，也可於本研究所獲得之 *hflB* 基因所推衍之胺基酸序列中發現，而在其推衍蛋白質之結構預測結果也顯示該蛋白質第 187 個至第 428 個胺基酸之蛋白質結構預測與 *Thermus thermophilus hflB* 基因轉譯蛋白中之 AAA domain 相似，其中包含有 ATP binding site、walker B motif 與作為 arginine finger 之 Arg³⁵⁰；而在第 442 個至第 620 個胺基酸之蛋白質結構預測則與 *Aquifex aeolicus* 其 *hflB* 基因轉譯蛋白中之 protease domain 相似，主由 5 個 helices 所構成，包含有由 Tyr⁵⁸¹、Ala⁵⁸⁴、Leu⁵⁸⁸、Val⁵⁹⁵、Leu⁵⁹⁸ 與 Leu⁶⁰² 所共同組成之 leucine zipper；另外，在近 C 端所具有之 HEAGH Zinc-binding motif 則位於第 452 個至第 456 個胺基酸間^(18, 19) (蛋白質結構預測圖在此未呈現)，故推測該 ORF 即為花生簇葉病菌質體之 *hflB* 基因，其核酸組成為 A: 37.17%，G: 16.33%，T: 34.11%，C: 12.34%，A+T 比值為 71.28%，G+C 比值為 28.67%，轉譯起始碼為 ATG，終止碼為 TAA，共可轉譯出 685 個胺基酸。在此基因之起始碼上游約 7 個鹼基處亦發現一可能之核糖體鍵結處，以及可能之 -10 element 與 -35 element。另外，未知功能之假設性蛋白質與 *hflB* 基因相距 83 bp，轉譯起始碼為 ATG，共可轉譯出 22 個胺基酸，其起始碼上游約 4 個鹼基處也發現一可能核糖體鍵結處。

serS 與 *hflB* 基因之轉錄起始點分析

將該 RNA/ cDNA hybrid 連同植株之全 RNA 與全 DNA 分別作為模版，以各組 PCR 引子對進行 PCR 之增幅，其中以 RNA 作為模版者皆無增幅產物產生，表示由植株純化之 RNA 中已無 DNA 殘存。另外，當以 RNA/ cDNA hybrid 及 DNA 為模版者進行 PCR 時各組 PCR 引子皆有增幅片段產生 (圖三)，且產物大小也與預測符合，其中 wsf10/ wsr7 與 wsf10/ wsr11 兩組引子對之引子序列位於基因內部且其增幅產物橫跨 *rpsT* 與 *serS* 之基因間區域 (intergenic region)，而 wsf17/ wsr12 之引子序列位於基因內部且其增幅產物則橫跨 *serS* 與 *hflB* 之基因間區域，經選殖與解序分析後，與本研究所獲得之花生簇葉病菌質體基因體片段序列相吻合，顯示 *rpsT*、*serS* 與 *hflB* 均能進行 RNA 表現，且位於同一轉錄產物上，顯示其位於同一多基因操縱組 (polycistronic operon)。

討 論

本研究利用基因選殖技術，建構花生簇葉病植物菌質體次基因庫，經由菌落雜合技術篩選，獲得花生簇葉病菌質體之 *serS* 基因、*rpsT* 基因與 *hflB* 基因，並針對其核酸序列、轉錄產物之表現與調控以及轉譯產物結構進行探討與分析。本實驗室先前對花生簇葉病菌質體之基因體進行逢機定序 (random sequencing, shotgun) 分析，所得之轉型株 clone 22⁽²²⁾，經定序分析獲得花生簇葉病菌質體 *serS* 基因之部分核酸序列，以該序列為基礎，進行一系列選殖與分析之實驗，確立 *serS* 基因在花生簇葉病菌質體內為單一套組，並取得其全長序列。雖然在前人研究中指出在 16S rDNA 序列分析上，植物菌質體與 *Mycoplasma genitalium* 及 *M. pneumoniae* 之關係比與 *B. subtilis* 更為接近。然而由 Miyata 等學者於洋蔥黃化病菌質體 *str operon* 之研究中，若將植物菌質體在其基因編制與遺傳密碼使用上與 *Mycoplasma spp.* 及 *B. subtilis* 之情況相比，則發現植物菌質體與 *B. subtilis* 更為相似⁽¹⁴⁾，此一現象也與本研究中獲取之 *serS* 基因與 *Mycoplasma spp.* 及 *B. subtilis* 之序列比對分析之結果相吻合。胺基酸序列之比對結果，雖在相同度上約為 50%，然而在相似度上則提高至 70%，顯示絲胺基化 tRNA 合成酵素在蛋白質結構與特性上的高保守性。由功能性區塊來看，catalytic domain 比 N-terminal domain 有更高的保守性，尤其在其三個 motif 上^(6, 8)。由於 N-terminal domain 主要負責辨識 tRNA^{Ser} 之額外環，此一構造因其在各物種間之高變異度性，故其也被稱為 long



圖三、以反轉錄聚合酵素連鎖反應分析 *rpsT* 基因、*serS* 基因與 *hflB* 基因之轉錄產物。

Fig. 3. Transcript of *rpsT*, *serS* and *hflB* in PnWB phytoplasma was verified using RT-PCR. Primer pairs that spanned the intergenic region wsf10/ wsr7 (A), wsf10/ wsr11 (B), wsf17/ wsr12 (C) were used for polymerase chain reaction. PCR was conducted using total cDNA reverse transcribed from total RNA of periwinkle infected with PnWB phytoplasma (lane 1) (the first strand cDNAs were synthesized using primers wsr7, wsr11 and wsr12, respectively) and healthy periwinkle (lane 2) (primers wsr7, wsr11 and wsr12 were also used, respectively), total RNA prepared from periwinkle infected with PnWB phytoplasma (lane 3) and healthy periwinkle (lane 4), total DNA prepared from periwinkle infected with PnWB phytoplasma (lane 5) and healthy periwinkle (lane 6) as templates. PCR products were separated in a 1.0 % agarose gel. M, GeneRuler™ 1 kb DNA ladder (Fermentas Life Science) as molecular weight standards in (A) and (C). M, 100 bp DNA ladder as molecular weight standards in (B). Sizes (in bp) of PCR products are shown on the right margins.

variable arm。為減少轉譯時辨識上之失誤，一般相信 tRNA 與胺醯基化 tRNA 合成酵素間存在共演化之關係，此外在前人研究中也顯示，兩者間之辨識機制主要是藉由與 tRNA^{Ser} 額外環骨架 (backbone) 構型之契合，而更甚於鹼基間之專一性配對，因此在兩者中皆未見保守性序列，而是隨著演化而累積變異。在各物種間之序列不盡相同，取而代之的則是在該功能性區塊與 tRNA^{Ser} 額外環構型在物種間之高相似度，以維持兩者間之專一性辨識。相對的，由於 catalytic domain 為活性部位之所在處，其辨識者主要是絲胺酸與 tRNA^{Ser} 之 acceptor stem，此兩者即使在不同物種中，也幾乎不存在差異，因此具有較高之保守性^(6, 8, 13)。

由於 *rpsT* 基因在四個已知基因體序列之植物菌質體洋蔥黃化病菌質體 OY-M、翠菊黃化簇葉病菌質體、*Ca. Phytoplasma australiense* 與 *Ca. Phytoplasma mali* 中皆位於 *serS* 基因之上游，且皆為單一套組。在此將獲得之 *rpsT* 基因與此四者進行核酸序列與胺基酸序列比對，發現其間具一定的保守性。於胺基酸序列之比對結果，雖在相同度上約為 50%，然而在相似度上則提高至 60%，說明此蛋白質之保守性主要在構型與特性上。而接近該蛋白質之 N 端處，具有較高之保守性，由於在與 16S rRNA 之結合中，此蛋白質首先直接與 16S rRNA 之 5' domain 結合，鑒於 16S rRNA 於同物種中之高保守性，因此推論該處主要負責與 16S rRNA 之 5' domain 之辨識與結合^(11, 17)。

此外，因 *hflB* 之基因在該上述四個植物菌質體中之套組數 (copy number) 變動大，多數皆至少具有 5 個套組數，只有在 *Ca. Phytoplasma australiense* 中為兩個套組數；該基因之轉譯產物大小各異，主要共同特性僅在於具有 AAA domain 與 protease domain；且在這些序列中，有部分為 pseudogene 或是可能為 *hflB* 基因，因此基於以上三點，在此僅就經由 NCBI 之 BLAST 比對所獲得在該四個植物菌質體與 *Acholeplasma laidlawii* 基因體中相似之 *hflB* 基因，就其核酸序列與胺基酸序列進行比對，而不對各生物體中之其他套組之 *hflB* 基因進行比對。結果顯示，其序列之保守性主在於二功能性區塊 AAA domain 與 protease domain 間，因此造成胺基酸序列之相同度僅接近 40%，而相似度則為 50%。

由於在 RT-PCR 之結果中顯示此三基因位於同一操縱組 (operon)，此操縱組中有較長之基因間區域，分別為 *rpsT* 基因與 *serS* 基因間之 90 bp 以及 *serS* 基因與 *hflB* 基因間之 54 bp，然而也可藉由在其他操縱組中所存在長基因間距之例子，說明此一特性所具有之意義。在許多細菌負責轉譯生成 F₀F₁ ATPase 之 *atp*

operon 中都具有長基因間距存在，其長度甚至可達 162 bp (*B. subtilis* 之 *atpE* 與 *atpF* 間)，此類之基因間距中常具有迴文 (palindrome) 之序列，藉由該序列 mRNA 可以形成特殊二級結構如 hairpin 或類似 t-RNA 之結構等，據推測這些特性具有保護此 mRNA 免於受到其他核酸酵素 (nuclease) 之分解；此外，這些結構也類似於終止子 (terminator) 之構型，因此也不排除藉由該區域進行基因表現調控之可能性^(10, 16)。在所獲得之 90 bp 基因間距中可發現三組迴文序列，與前人研究中之特性符合，因此推測其 mRNA 主藉由三個 hairpin 結構，減低被分解之機率。此外，在 90 bp 基因間距中發現了可能之啟動子 (promoter) 序列，以及在 54 bp 基因間距中也發現到可能之核糖體鍵結處與啟動子序列，此些序列也常見於操縱組之長基因間距中^(10, 16)，並推測其與表現量之調控有關，或亦有助於核糖體橫越基因間距。而有關操縱組之組成基因，該等組成基因一般多為功能相關或是彼此間有相互作用之基因，而在本研究獲得之操縱組中所涵蓋包含的三基因，其轉譯產物似乎不具有此項特性，然而在有類似情形之操縱組中，最著名之例子即是在 1983 年時於 *E. coli* 中發現之 macromolecular synthesis (MMS) operon，此一操縱組由 *rpsU-dnaG-rpoD* 三基因所組成，各基因之轉譯產物分別參與於不同之 pathway 中，在操縱組內具有三個啟動子序列，認為其與該基因之調控有關，該操縱組曾被稱為在 *E. coli* 中最為複雜之操縱組^(9, 15, 20)，而此一發現也說明操縱組內之基因組成非一定為功能相關者。

本研究於花生簇葉病菌質體中發現一全新操縱組，對於此操縱組之表現特性與其轉錄產物大小仍需進一步研究分析。此外該操縱組目前也存在著許多疑問待解，例如：在其他植物菌質體中是否也同樣具有此一操縱組？此操縱組之組成基因與契機為何？以及其演化過程為何？等問題。此操縱組之發現僅為一個開端，其中所蘊含之意義，有待更多之研究予以探討。

引用文獻 (LITERATURE CITED)

1. Agrios, G. N. 2005. Plant diseases caused by Mollicutes: phytoplasmas and spiroplasmas. Pages 687-703 in: Plant Pathology, 5th ed. Elsevier Academic Press, San Diego, CA.
2. Ahel, D., Slade, D., Mocibob, M., Söll, D., and Weygand-Durasevic, I. 2005. Selective inhibition of divergent seryl-tRNA synthetase by serine analogues. FEBS Lett. 579: 4344-4348.
3. Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., and Schwede, T. 2006. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology

- modelling. *Bioinformatics* 22: 195-201.
4. Beuning, P. J., and Musier-Forsyth, K. 1999. Transfer RNA recognition by aminoacyl-tRNA synthetases. *Biopolymers* 52: 1-28.
 5. Bilokapic, S., Maier, T., Ahel, D., Gruic-Sovulj, I., Soll, D., Weygand-Durasevic, I., and Ban, N. 2006. Structure of the unusual seryl-tRNA synthetase reveals a distinct zinc-dependent mode of substrate recognition. *EMBO J.* 25: 2498-2509.
 6. Borel, F., Vincent, C., Leberman, R., and Härtle, M. 1994. Seryl-tRNA synthetase from *Escherichia coli*: implication of its N-terminal domain in aminoacylation activity and specificity. *Nucleic Acids Res.* 22: 2963-2969.
 7. Condon, C., Grunberg-Manago, M., and Putzer, H. 1996. Aminoacyl-tRNA synthetase gene regulation in *Bacillus subtilis*. *Biochimie* 78: 381-389.
 8. Cusack, S., Härtle, M., and Leberman, R. 1991. Sequence, structural and evolutionary relationships between class 2 aminoacyl-tRNA synthetases. *Nucleic Acids Res.* 19: 3489-3498.
 9. Dam, P., Olman, V., Harris, K., Su, Z., and Xu, Y. 2007. Operon prediction using both genome-specific and general genomic information. *Nucleic Acids Res.* 35: 288-298.
 10. Das, A., and Ljungdahl, L. G. 1997. Composition and primary structure of the F₁F₀ ATP synthase from the obligately anaerobic bacterium *Clostridium thermoaceticum*. *J. Bacteriol.* 179: 3746-3755.
 11. Dutca, L. M., and Culver, G. M. 2008. Assembly of the 5' and 3' minor domain of 16S ribosomal RNA as monitored by tethered probing from ribosomal protein S20. *J. Mol. Biol.* 376: 92-208.
 12. 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.
 13. Lemhard, B., Orellana, O., Ibba, M., and Weygand-Durasevic, I. 1999. tRNA recognition and evolution of determinants in seryl-tRNA synthesis. *Nucleic Acids Res.* 27: 721-729.
 14. Miyata, S., Furuki, K., Oshima, K., Sawayanagi, T., Nishigawa, H., Kakizawa, S., Jung, H. Y., Ugaki, M., and Namba, S. 2002. Complete nucleotide sequence of the S10-spc operon of phytoplasma: gene organization and genetic code resemble those of *Bacillus subtilis*. *DNA Cell Biol.* 21: 527-534.
 15. Nesin, M., Lupski, J. R., and Godson G. N. 1988. Role of the 5' upstream sequence and tandem promoters in regulation of the *rpsU-dnaG-rpoD* macromolecular synthesis operon. *J. Bacteriol.* 170: 5759-5764.
 16. Santana, M., Ionescu, M. S., Vertes, A., Longin, R., Kunst, F., Danchin, A., and Glaser, P. 1994. *Bacillus subtilis* F₀F₁ ATPase: DNA sequence of the *atp* operon and characterization of *atp* mutants. *J. Bacteriol.* 176: 6802-6811.
 17. Schuwirth, B. S., Borovinskaya, M. A., Hau, C. W., Zhang, W., Vila-Sanjurjo, A., Holton, J. M., and Cate, J. H. 2005. Structure of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science* 310: 827-834.
 18. Shotland, Y., Teff, D., Koby, S., Kobiler, O., and Oppenheim, A. B. 2000. Characterization of a conserved alpha-helical, coiled-coil motif at the C-terminal domain of the ATP-dependent FtsH (HflB) protease of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 299: 953-964.
 19. Schumann, W. 1999. FtsH - a single chain charonin. *FEMS. Microbiol. Rev.* 23: 1-11.
 20. Versalovic, J., Koeuth, T., Britton, R., Geszvain, K., and Lupski, J. R. 1993. Conservation and evolution of the *rpsU-dnaG-rpoD* macromolecular synthesis operon in bacteria. *Mol. Microbiol.* 8: 343-355.
 21. Wei, W., Davis, R. E., Lee, I.-M. and Zhao, Y. 2007. Computer simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 1855-1867.
 22. Wei, H. C., and Lin, C. P. 2004. Cloning and sequencing of extrachromosomal DNA and insertion sequence of phytoplasma associated with peanut withes, broom using random sequencing. *Plant Pathol. Bull.* 13: 143-154.
 23. Verwoerd, T. C., Dekker, B. M. M., and Hockema, A. 1989. A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Res.* 17: 2362.
 24. Yang, I. L., and Wu, S. Y. 1990. The latent period of peanut withes' broom agent in the vector *Orosius orientalis*. *J. Agric. Res. China* 39: 204-207.

ABSTRACT

Lu, P. Y.¹, and Lin, C. P.^{1,2} 2009. Cloning and analysis of *rpsT*, *serS* and *hflB* genes of peanut witches'-broom phytoplasma. *Plant Pathol. Bull.* 18: 57-66. (¹Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan 106, R.O.C.; ²Corresponding author, E-mail: cplin@ntu.edu.tw; Fax: +886-2-2366-1980)

To investigate *serS* gene in peanut witches'-broom (PnWB) phytoplasma, subgenomic libraries of PnWB phytoplasma were constructed in this study. Clone SI419 was obtained from the PnWB phytoplasma *SpeI*-restriction subgenomic library by colony hybridization using a probe containing partial *serS* gene sequence of PnWB phytoplasma. To obtain the 5' end sequence of *serS*, another probe WS8-6 was amplified according to the sequence of cloned fragment of SI419. Clone HIII236 was then selected from the PnWB phytoplasma *HindIII*-restriction subgenomic library. Sequences of the cloned fragments of SI419 and HIII236 were integrated and analyzed to reveal that the sequences may contain four putative open reading frames (ORFs 1-4). The deduced amino acid sequences of ORF1, ORF2 and ORF3 showed homology with those of *rpsT* gene, *serS* gene and *hflB* gene, respectively. On the other hand, amino acid sequence of the ORF4 probably encodes a hypothetical protein with no significant homology to any known sequences. To clone complete *rpsT* gene, a degenerate PCR primer was designed according to the 5' conserved region of phytoplasma *rpsT* gene, a clone CW67 with full length of *rpsT* gene was then obtained using PCR-based cloning strategy. The 3,902 bp genomic DNA sequence of PnWB phytoplasma was determined from the sequences of the cloned fragments of SI419, HIII236 and CW67 using SeqMan sequence analysis program. The fragment contains full length of *rpsT* gene, *serS* gene, *hflB* gene and an incomplete ORF4 in order. PCR fragments that spanned the *rpsT-serS* and *serS-hflB* intergenic region were amplified separately in RT-PCR using the total RNA prepared from PnWB-affected periwinkle as template, and the sequences of PCR products were identical to the corresponding sequences of the 3,902 bp PnWB phytoplasma genomic fragment. RT-PCR experiments indicate that the three genes are expressed as a single transcript, demonstrating that they constitute an operon.